

THESE

présentée

à l'Université de Provence

pour obtenir

le Grade de Docteur es-Sciences Naturelles

par

Georges REYNAUD

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RELATIONS ENTRE SOMA ET GERME
CHEZ LE POULET AU MOYEN D'UNE TECHNIQUE DE TRANSFERT
DES GONOCYTES PRIMORDIAUX**

Soutenue le **15 SEP.**

1973, devant la Commission d'examen

Mlle R. CHANDEBOIS

Président

MM. P.-D. NIEUWKOOP
J. CRESP

}

Examineurs

Sous la Présidence d'honneur de **M. J. BENOIT**,
Professeur honoraire au Collège de France.

THESE

présentée

à l'Université de Provence

pour obtenir

le Grade de Docteur es-Sciences Naturelles

par

Georges REYNAUD

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RELATIONS ENTRE SOMA ET GERME
CHEZ LE POULET AU MOYEN D'UNE TECHNIQUE DE TRANSFERT
DES GONOCYTES PRIMORDIAUX**

Soutenue le

1973, devant la Commission d'examen

Mlle R. CHANDEBOIS

Président

**MM. P.-D. NIEUWKOOP
J. Cresp**

Examineurs

Sous la Présidence d'honneur de **M. J. BENOIT**,
Professeur honoraire au Collège de France.

THÈSE

présentée

à l'Université de Provence

pour obtenir

le Grade de Docteur en Sciences Mathématiques

par

Georges REYNALD

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RELATIONS ENTRE GOMME ET CIMENT
CHEZ LE POULET AU MOYEN D'UNE TECHNIQUE DE TRANSFERT
DES GOMMOTES PRIMORDIAUX



Reçu par la Bibliothèque de la Faculté de Sciences

le 10/11/68

Reçu par la Bibliothèque de la Faculté de Sciences

le 10/11/68

Reçu par la Bibliothèque de la Faculté de Sciences
le 10/11/68

Reçu par la Bibliothèque de la Faculté de Sciences
le 10/11/68

UNIVERSITE DE PROVENCE

U.E.R. SCIENTIFIQUES

Président : F. BOREL

Secrétaire général : C. MOYNAULT

Professeurs

MM. J. VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides
P. ROUARD	Physique générale
P. DESNUELLE	Chimie biologique
M. MERIGOUX	Physique industrielle
C. FEHRENBACH	Astronomie
A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère
A. GUILLEMONAT	Chimie industrielle
G. CARPENI	Chimie
Y. DOUCET	Physique
JM. SOURIAU	Méthodes mathématiques de la physique
J. METZGER	Chimie
L. FOURES	Mathématiques
D. MALE	Physique
G. BODIOU	Mathématiques appliquées
M. NAUDET	Chimie des corps gras
P. BOUSQUET	Physique
P. PESTEIL	Physique
P. CASAL	Mécanique rationnelle et appliquée
G. GOUVERNET	Géologie appliquée
A. VISCONTI	Physique théorique

MM. A. BLANCHARD	Mathématiques générales
M. DUSSARDIER	Physiologie animale
P. QUEZEL	Botanique
A. JULG	Chimie théorique
S. TAXY (Mme)	Géologie historique
F. TESSIER	Géologie générale
ML. FURNESTIN (Mme)	Biologie animale
M. BERTRAND	Chimie
J. TROMPETTE	Physique
M. LAFITTE	Chimie
R. FRAISSE	Mathématiques
C. BLANCHARD (Mme)	Mathématiques
R. NEGRE	Biologie végétale
R. COULON	Physique
R. KERN	Minéralogie
L. SIDERIADES	Physique
JM. SURZUR	Chimie organique
H. CHANTREL	Physique de l'espace
J. SOUGY	Géologie
J. HERVE	Electronique
H. BODOT	Chimie
J. CHOUTEAU	Physiologie animale
R. PHILIP	Physique
L. CAPELLA	Minéralogie
P. BILLARD	Mathématiques
M. BONNEAU	Mathématiques
JC. TRAYNARD	Chimie industrielle
C. CLARION (Mlle)	Mécanique des fluides
A. PONS	Botanique
A. GIRARDIE	Zoologie
J. MANDELBROJT	Physique
M. BIZOUARD	Physique
JP. DAVID	Physique
JC. MAIRE	Chimie

MM. M. SIMON	Physiologie animale
G. MARCHIS-MOUREN	Chimie biologique
R. PETIT	Physique
M. HUGON	Psycho-physiologie

Professeurs sans chaire

MM. R. AMAR	Zoologie
L. DEVEZE	Biologie marine
F. BOREL	Techniques mathématiques de la physique
R. CHANDEBOIS (Mlle)	Biologie animale
H. GUENOCHÉ	Mathématiques appliquées
J. HENNEQUIN	Electronique
S. GUERARD (Mlle)	Pétrographie
C. FEUGEAS	Chimie
J. CABANE	Chimie
G. RASIGNI	Physique
S. COMBET	Chimie
R. GARRON	Physique expérimentale
M. CADILHAC	Physique
B. WAEGELL	Chimie
F. HALBWACHS	Physique
M. PICHENOT (Mlle)	Biologie végétale
M. GILLET	Physique
L. SARDA	Biochimie
C. ROMAN	Physiologie animale
A. GILLET	Mathématiques
S. MARTINUZZI	Physique

Maîtres de Conférences

MM. PATIN	Chimie
CRESP	Biologie animale
BENARROCHE	Physique
TACHOIRE	Chimie
VINCENT	Chimie
VICENTE	Biologie animale
MANUCEAU	Mathématiques
GUERMEUR	Physique
DELAAGE	Biochimie
CATZIGRAS (Mlle)	Géologie
SIRUGUE (Mme)	Physique
MERDY	Physique
PUJOL	Chimie
LAVAGNE	Biologie végétale
GIUDICELLI	Biologie animale
FOUGEREAU	Biochimie
NOAT	Physiologie végétale
BOUDET	Mathématiques
STREIFF	Chimie
BELAICH	Microbiologie
NEVILLE	Biologie végétale
SOUBLIN	Mathématiques
DELACHE (Mme)	Mathématiques
CASALOT	Chimie
MOULINS	Biologie animale
DETRAZ	Mathématiques
BENLIAN	Chimie
MARTINET	Mathématiques
FARDOUX	Mathématiques

AVANT - PROPOS

Avant de commencer l'exposé de mon travail, je tiens à remercier tous ceux qui ont rendu possible sa réalisation.

Mlle le Professeur CHANDEBOIS, en me confiant un poste d'Assistant dans son laboratoire, m'a proposé ce sujet de thèse et a suivi de très près la progression de mes recherches. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer aujourd'hui ma profonde gratitude pour les conseils, les critiques et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer.

M. le Professeur NIEUWKOOP m'a très aimablement accueilli dans son Institut d'Embryologie d'Utrecht. Il m'a fait bénéficier d'un enseignement théorique et pratique d'une valeur exceptionnelle qui a été décisif pour la mise en oeuvre de mon programme d'expériences. Depuis, en dépit de ses nombreuses obligations, il s'est constamment intéressé à mon travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie vivement M. CRESP, Maître de Conférences, qui a également suivi mes recherches et qui a bien voulu accepter de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à M. le Professeur BENOIT qui m'a prodigué ses encouragements et qui m'a fait le grand honneur de se joindre à ce jury. Je le prie d'accepter ici le témoignage de ma haute considération.

M. le Professeur ABELOOS avait assumé la présidence de mon jury de thèse de spécialité que le présent mémoire prolonge et développe. Qu'il soit de nouveau assuré de toute ma gratitude.

M. le Professeur GALLIEN, Membre de l'Institut, a accepté la charge de présenter mes notes préliminaires à l'Académie des Sciences. Je le remercie pour l'intérêt qu'il m'a témoigné.

Que toute l'équipe de recherche du laboratoire HUBRECHT - et tout particulièrement le Docteur HARA - trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à M. le Docteur LEROY qui m'a obligeamment fait bénéficier de ses connaissances et de ses conseils.

Je suis particulièrement heureux de pouvoir remercier ici tout le personnel enseignant et technique du laboratoire de Morphogénétique animale auprès duquel j'ai trouvé l'aide matérielle indispensable à la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin le C.N.R.S. pour la subvention accordée au cours de mon stage au Laboratoire HUBRECHT d'Utrecht.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	5
A - <u>Choix du matériel expérimental et techniques d'élevage</u>	5
1/ Choix du matériel expérimental	5
Provenance des races utilisées (6)	
2/ Elevage	6
Technique d'insémination artificielle (7)	
Conduite de l'incubation (8)	
B - <u>Techniques opératoires</u>	9
1/ Processus général	9
Conditions d'asepsie (9) Mirage des oeufs (9)	
Ouverture des oeufs (10) Détermination des	
stades embryonnaires (11) Soins postopératoires	
(12)	
2/ Différents types d'interventions	13
a) Irradiation du croissant germinale aux rayons	
ultraviolets (13)	
Caractéristiques de l'appareil à rayons	
ultraviolets (13)	
Ecrans (14)	
Dispositif expérimental (15)	
Doses d'ultraviolet administrées (16)	
b) Séparation des feuillets blastodermiques (16)	
Prélèvement du blastoderme (17)	
Isolement de l'endoblaste (17)	
c) Dissociation cellulaire de l'endoblaste du	
croissant germinale (19)	
d) Injection des cellules dans le réseau	
vasculaire vitellin (20)	
C - <u>Techniques d'histologie et d'histochemie</u>	22
D - <u>Techniques cytologiques</u>	25
1/ Coloration des suspensions cellulaires	25
2/ Mesures cellulaires	25
3/ Dénombrements cellulaires	26
E - <u>Sigles et nomenclature</u>	28
<u>CHAPITRE I : Mise au point d'une technique de remplacement</u>	
des CGP	29
Introduction	29

II

A - <u>Stérilisation de l'hôte</u>	32
1/ Méthode expérimentale	32
a) Irradiation précoce du croissant germinale en vue de l'étude de la dégénérescence des CGP (32)	
b) Irradiation tardive du croissant germinale en vue d'une stérilisation compatible avec la survie embryonnaire (34)	
2/ Effets tératogènes et létaux de l'irradiation	34
3/ Résultats - Contrôle de la stérilité	35
a) Témoins (35)	
b) Sujets expérimentés (38)	
c) Description d'un coq stérile (41)	
4/ Discussion	42
B - <u>Transfert des CGP du donneur de l'hôte stérile</u>	45
1/ Méthode expérimentale	45
a) Préparation de la suspension de CGP destinée à être injectée (45)	
b) Dénombrement des CGP dans les suspensions cellulaires (46)	
c) Injection de l'hôte des CGP du donneur (49)	
d) Effets létaux de l'injection (50)	
e) Identification des cellules germinales (52)	
2/ Résultats. Peuplement des gonades stériles par les CGP injectées	54
a) Colonisation des ébauches gonadiques du Poulet par des gonocytes de Dindon (54)	
b) Transfert des gonocytes primordiaux entre Poulets de races différentes (58)	
3/ Discussion	58
Résumé	60
 <u>CHAPITRE II : Fixation et prolifération des CGP transférées</u> ...	63
A - <u>Durée de la compétence des ébauches gonadiques</u>	63
1/ Introduction	63
2/ Méthode expérimentale	65
3/ Résultats	65
a) Embryons injectés à 4 jours (66)	
b) Embryons injectés à 5 jours (68)	
c) Embryons injectés à 6 jours (68)	
4/ Discussion	68

III

B - <u>Régulation des populations de gonocytes primaires</u>	70
1/ Méthodes	70
2/ Résultats	71
3/ Discussion	74
Résumé	76
 <u>CHAPITRE III : Transferts interspécifiques de CGP.</u>	
Caractères sexuels et pouvoir reproducteur de poulets porteurs d'un germen de dindon	77
A - <u>Phénotype et caractères sexuels des sujets expérimentés</u>	77
1/ Sujets mâles	77
Phénotype et caractères sexuels secondaires (77)	
Gamètes et caractères sexuels accessoires (78)	
2/ Sujet femelle	79
Phénotype et caractères sexuels secondaires (79)	
Gamètes et caractères sexuels accessoires (79)	
B - <u>Résultats des croisements entre sujets normaux et expérimentés</u>	80
1/ Croisements entre individus de même soma	80
a) Croisement entré coq expérimenté et poule normale / M(g) x G / (80)	
Descendance du coq Mg ♂ n°1 (80)	
Descendance du coq Mg ♂ n°2 (82)	
Comparaison de ce croisement avec l'hybridation Dindon x Poule (M x G) (82)	
b) Croisement entre coq normal et poule expérimentée / G x M(g) / (84)	
Comparaison de ce croisement avec l'hybridation coq x dinde (G x M) (84)	
2/ Croisements entre individus de même germen	85
a) Croisement entre coq expérimenté et dinde normale / M(g) x M / (85)	
Descendance du coq M(g) ♂ n°1 (86)	
Descendance du coq M(g) ♂ n°2 (86)	
Comparaison avec l'accouplement normal du dindon et de la dinde (87)	
b) Croisement entre dindon normal et poule expérimentée / M x M(g) / (88)	
Embryon MM(g) n°1 (89)	
Embryons MM(g) n°2 et 3 (89)	
Embryon MM(g) n°4 (90)	
Comparaison avec l'accouplement normal du dindon et de la dinde (91)	

IV

3/ Discussion	93
a) Causes possibles de l'arrêt de la production des gamètes (93) Facteur intrinsèque (93) Facteur extrinsèque (94)	
b) Causes possibles de la modification des gamètes (95)	
c) Facteurs limitant la fécondation des sujets expérimentés (96) Facteurs pouvant abaisser les pourcentages de fécondations (96) Facteurs pouvant bloquer le développement embryonnaire (98) Causes des anomalies embryonnaires et des modifica- tions phénotypiques (98)	

Résumé	101
--------------	-----

<u>CHAPITRE IV</u> : Transferts intraspécifiques de CGP. Pouvoir reproducteur et descendance (F_1) de poulets porteurs d'un germen de race différente	103
A - <u>Phénotype et caractères sexuels des sujets expérimentés</u> .	103
B - <u>Gamètes, fécondité et descendance (F_1) des sujets expérimentés</u>	104
1/ Poule R(w) n°1	104
2/ Poule R(w) n°2	105
a) Oeufs (105)	
b) Fécondité et descendance (106) Phénotype des sujets RR(w) qui ont franchi le stade 39 HH (13 jours) (108) RR(w) n°5 (108) RR(w) n°6 (108)	
3/ Poule W(r)	109
a) Oeufs (110)	
b) Fécondité et descendance (110) Phénotype des sujets WW(r) qui ont franchi le stade 39 HH (13 jours) (112)	
C - <u>Discussion</u>	114
Résumé	117
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	120
<u>RESUME</u>	123

I N T R O D U C T I O N

Les théories de la *lignée germinale* (NUSSBAUM, 1880) et du *plasma germinatif* (WEISMANN, 1885), qui impliquent l'indépendance du germen - considéré en tant que support matériel du patrimoine héréditaire - vis-à-vis du soma, ont suscité un grand nombre de travaux expérimentaux. Chez les Vertébrés, l'une des premières expériences a consisté à échanger les ovaires entre deux femelles adultes de races différentes, puis à étudier leur descendance après qu'elles aient été fécondées par des mâles normaux de même soma ou de même germen. Les travaux réalisés chez les Mammifères (CASTLE et PHILIPPS, 1913 ; WIESNER, 1923) montrèrent tous que les ovocytes mûris dans des gonades greffées n'étaient pas modifiés par le soma de l'hôte. Chez les Oiseaux, au contraire, GUTHRIE (1908) prétendit que le soma maternel influençait les cellules germinales de l'ovaire transplanté. Des poules greffées, fécondées par des coqs de même race que celle de leur ovaire, semblaient en effet transmettre aux poussins qu'elles engendraient des caractères de leur pigmentation plumaire. Mais DAVENPORT (1911), ayant reproduit ces expériences, ne releva que de très rares discordances entre les phénotypes des sujets obtenus et ceux des hybrides. Il en conclut que les oeufs avaient été produits par des restes de l'ovaire initial, mal extirpé, et non par l'ovaire greffé. L'étude du problème fut ensuite reprise par PAVLOV (1951) chez la poule et par NOVIKOV (1953, 1965) qui échangea des testicules entre des poussins de Poulet puis de Canard. Les deux auteurs, ayant pris les précautions nécessaires pour éviter une erreur d'interprétation et ayant néanmoins observé des modifications de plumage dans la descendance des sujets greffés, ont conclu comme GUTHRIE, à la possibilité d'une modification des gamètes transférés par le soma de l'hôte. BENOIT et BRARD (1968, a,b), qui ont fait récemment des greffes interraciales d'ovaires chez la Caille, ainsi que des greffes testiculaires chez le Poulet (BRARD et BENOIT, 1969), n'ont obtenu jusqu'ici aucun argument pour ou contre la thèse de l'*induction somatique* défendue par les auteurs soviétiques.

Tous les types de greffe gonadique rapportés ci-dessus présentent l'inconvénient d'introduire chez l'hôte castré non seulement un germe étranger, mais aussi les tissus somatiques de la gonade. Or, si le soma fournit aux cellules germinales des substances porteuses d'information - ou susceptibles de modifier leur propre information - certaines d'entre elles sont probablement élaborées par des cellules gonadiques (cellules folliculeuses de l'ovaire, cellules de Sertoli du testicule). En effet, l'étude biochimique et ultrastructurale de la gamétogenèse a montré que, dans les deux sexes, ces cellules ont un rôle nourricier vis-à-vis des gonocytes, ainsi qu'un rôle de coordination des transformations cytologiques qui accompagnent leur maturation (FLICKINGER et FAWCETT, 1967 ; GONDOS 1970). Bien que quelques travaux aient été faits chez le sexe mâle (NAGANO, 1962 ; NICANDER, 1967), c'est sans doute chez la femelle, où les apports de matériaux nécessités par la croissance de l'ovocyte sont de loin les plus importants, que l'on connaît le mieux les relations structurales et fonctionnelles entre cellules germinales et cellules nourricières. Chez les Oiseaux, comme chez tous les Vertébrés, elles sont en contact très intime grâce à la présence de desmosomes, de microvillosités ovocytaires et de projections folliculaires (PRESS, 1959 ; BELLAIRS, 1965, 1967). Ces structures d'association permettent le transfert de substances de poids moléculaire élevé, voire d'éléments figurés ("corps limitants" de BELLAIRS) des cellules folliculeuses à l'ovocyte. D'un autre côté, les activités sécrétrices et anaboliques des cellules de la granulosa sont bien connues. BELLAIRS (1967) a constaté que les cellules folliculeuses de la poule sont riches en ribonucléoprotéines qui passeraient dans l'ovocyte par micropinocytose et par "absorption de fragments spécialisés". Chez les Amphibiens, BRACHET (1965) considère que l'ADN cytoplasmique, associé au vitellus, est d'origine exogène (probablement hépatique) et qu'il provient de la lyse ou de l'incorporation des cellules folliculeuses. Chez les Amniotes cependant, il ne semble pas qu'il soit récupéré de cette façon (PETERSON, FICHTELIUS et LIDEN, 1967).

Cela étant dit, on voit tout l'intérêt qu'il y aurait à pouvoir faire passer dans les cellules germinales des acides nucléiques et des protéines

ayant une origine spécifique différente. En dehors des greffes de gonades, cette opération a déjà fait l'objet, chez les Oiseaux, de nombreuses tentatives regroupées sous le terme général d'"hybridation végétative" et qui se sont soldées par des résultats inconstants et controversés (cf. BENOIT, 1970 ; LEROY, 1963, 1969 ; L'HERITIER, 1963 ; LWOFF, 1963). Il apparaît toutefois que, par l'injection d'ADN ou de sang étranger à des individus adultes ou à des embryons, plusieurs chercheurs ont obtenu dès la F₁ l'induction ou le transfert de caractères transmissibles aux générations suivantes. Sans contester ces résultats, certains auteurs refusent de les attribuer à une action spécifique des acides nucléiques injectés, en invoquant notamment la dégradation rapide de ces molécules par les nucléases du sang. De plus, il faut souligner que les conditions métaboliques créées par ce type d'expérimentation sont probablement très différentes des conditions normales.

L'ensemble de ces travaux suggère qu'il serait préférable, pour pouvoir étudier les relations entre soma et germen, de remplacer les cellules germinales par des gonocytes étrangers, à un stade très précoce du développement, de façon à ne pas transférer le soma gonadique. Cela est possible puisque, chez tous les Vertébrés, les cellules germinales primordiales (CGP) qui sont à l'origine des gamètes, prennent naissance en dehors des ébauches gonadiques qu'elles colonisent au terme d'une migration dont les voies et la durée sont variables selon les groupes (cf. WOLFF, 1964). D'ailleurs, plusieurs tentatives de substitution des CGP ont déjà été faites, ayant ou non pour but l'étude des transferts d'information du soma au germen. Chez les Urodèles, NIEUWKOOP (1947), qui a réalisé le premier des échanges de mésoderme présomptif des lames latérales, contenant les CGP, entre deux gastrulas de Tritons d'espèces différentes, a noté la présence de gonocytes du type du donneur chez plusieurs hôtes. SMITH (1964) a repris ces expériences entre deux variétés d'Axolotls (blancs et noirs) et a observé, après croisement entre sujets blancs greffés et sujets blancs témoins, l'apparition de quelques hybrides noirs (la pigmentation noire étant sous le contrôle d'un gène dominant). Chez les Anoures, BLACKLER et FISHBERG (1961) ont effectué des échanges d'endoderme ventral contenant les CGP entre deux neurulas de *Xenopus* de races différentes, dont l'une possède un marqueur nucléolaire permettant de

repérer les cellules transférées. Les auteurs ont constaté que les gamètes produits par les sujets greffés étaient exclusivement du type du donneur et que la progéniture (F_1) issue du croisement entre ces sujets et des témoins de même soma était constituée par des hybrides classiques. Malheureusement, le croisement avec des témoins de même germe n'a pas été réalisé. De plus, il faut signaler que le transfert de matériel n'est pas limité aux CGP puisqu'il intéresse en fait une large portion de la région ventrale des neurulas, incluant les trois feuilletts. Par suite, le greffon contient aussi le mésoderme des lames latérales qui est précisément à l'origine d'une partie du soma gonadique, de sorte que sont recréées des conditions analogues à celles des greffes de gonades.

Pour parvenir à un transfert exclusif d'éléments germinaux, les Oiseaux paraissent mieux appropriés que les autres classes de Vertébrés. En effet, plusieurs auteurs depuis SWIFT (1914) jusqu'à SIMON (1960, a) avaient montré que leurs CGP étaient toutes contenues dans un territoire extra-embryonnaire à un stade précoce du développement. Cela offrait la possibilité, déjà exploitée d'ailleurs, de les détruire en bloc sans trop léser l'embryon.

Il était également acquis que les gonocytes primordiaux migraient ensuite en empruntant le réseau vasculaire pour aller coloniser les ébauches gonadiques. Ce réseau étant facilement accessible, on disposait d'un moyen pratique pour introduire de nouvelles CGP destinées à remplacer éventuellement celles que l'on aurait préalablement détruites. Cette possibilité avait aussi été exploitée auparavant par SIMON (1960, a) qui, grâce à une technique de parabiose circulatoire, avait obtenu *in vitro* la colonisation d'ébauches gonadiques de Poulet par des CGP de Canard.

A la lumière de ces derniers travaux, qui ont montré que rien ne s'opposait à la rétention de gonocytes par des gonades de spécificité différente, je me suis efforcé d'élaborer une méthode expérimentale pour réaliser la substitution des gonocytes primordiaux *in ovo*. Tout en permettant d'évaluer les possibilités de maintien et de développement d'éléments germinaux introduits dans un soma totalement étranger, cette méthode était susceptible de fournir de nouvelles données concernant les relations entre soma et germe.

MATERIEL ET METHODES

A - CHOIX DU MATERIEL EXPERIMENTAL ET TECHNIQUES D'ELEVAGE

1) CHOIX DU MATERIEL EXPERIMENTAL

Dès le début de mes tentatives de transfert de CGP, mon choix s'est porté sur le Poulet (*Gallus domesticus*) pour plusieurs raisons. Sur le plan pratique, les oeufs de poule s'obtiennent aisément en grande quantité et se développent bien en incubateur ; de plus, les poussins s'élèvent facilement et les adultes sont très résistants. Sur le plan théorique, cette espèce se recommandait aussi parce que ses CGP sont certainement parmi les mieux connues tant du point de vue de leur structure que de leurs propriétés.

Pour contrôler la réussite des transferts, il était indispensable - au moins dans un premier temps - de disposer de critères permettant de distinguer sur coupe histologique les cellules transférées de celles de l'hôte. La première possibilité qui s'offrait, en dehors du marquage artificiel généralement labile, était l'utilisation d'un donneur d'espèce différente dont les CGP pourraient présenter un ou plusieurs caractères morphologiques différents de ceux de l'hôte. Après investigation, le Dindon (*Meleagris gallopavo*) a été choisi parce que sa parenté phylogénétique avec le Poulet est assez étroite (MAINARDI, 1959, 1963) et que l'on peut facilement induire, pendant la vie embryonnaire, une tolérance immunitaire prolongée, voire définitive, entre les deux espèces (SIMONSEN, 1955 ; HRABA, 1956). En outre, les résultats de leur hybridation étant bien connus (OLSEN, 1960 ; KEMPENICH-PINTO *et al.*, 1970), ils pourraient être comparés à ceux de croisements éventuels entre *Gallus* normaux et *Gallus* porteurs d'un germen de *Meleagris*.

La possibilité de disposer d'un marqueur naturel stable, semblable à celui utilisé par BLACKLER et FISHBERG (1961) lors de transferts de

CGP chez *Xenopus*, a été un instant envisagée, à la suite de la découverte de nucléoles spéciaux dans les noyaux des cellules somatiques de la Caille japonaise (LE DOUARIN et BARQ, 1969). Malheureusement, les cellules germinales de cette espèce ne possèdent pas les mêmes nucléoles (REYNAUD, 1969 c).

Provenance des races utilisées

Dans la perspective d'avoir à contrôler les phénotypes des descendants de sujets expérimentés, on a estimé qu'il valait mieux tenter des transferts de cellules germinales entre des souches de volatiles à caractères stables, c'est-à-dire génétiquement sélectionnées. En ce qui concerne le Dindon, on s'est adressé à la race Petit Blanc de Beltsville, sélectionnée par le Centre d'Amélioration BETINA, de Séné (Morbihan). Pour ce qui est du Poulet, on a utilisé tantôt la race Rhode Island Red (RIR) représentée par la souche M_{44} de l'INRA, tantôt la race Wyandotte Blanche (WB, souche M_{11}), sélectionnées toutes deux depuis près de 20 ans à la Station Expérimentale d'Aviculture du Magneraud (Deux-Sèvres). Cependant, lors de certains transferts interspécifiques on a employé les produits plus robustes issus du croisement entre ces deux souches ($M_{44} \sigma \times M_{11} \varphi$), fournis par l'élevage marseillais de LA YOUNE.

2) ELEVAGE

L'élevage des animaux n'a porté jusqu'ici que sur une seule génération : celle des sujets expérimentés et de leurs partenaires sexuels intacts. Ceux-ci provenaient exclusivement de l'une ou l'autre des trois races mentionnées ci-dessus ou du métissage des deux dernières. Les poussins ont été élevés en commun mais les jeunes volailles ont été séparées les unes des autres dès les premiers indices de leur maturité sexuelle. Une fois formé, chaque couple a été isolé dans un poulailler clos (ou dans une cage) pendant toute la durée de l'expérience d'accouplement.

Technique d'insémination artificielle

Pour croiser des individus d'espèces différentes, il a fallu recourir à l'insémination artificielle. La technique, que j'ai apprise au Centre d'Elevage de la Société CORLAY de Marche (Drôme) s'inspire de celle de BURROWS et QUINN (1937). Je l'ai personnellement adaptée en fonction de mon propre matériel.

Le mâle destiné à fournir le sperme, après avoir été déplumé dans la région cloacale, est maintenu renversé sur le dos entre les mains d'un premier opérateur. Un second opérateur, placé face au premier, tient dans sa main gauche les pattes de la volaille et, dans sa main droite, un appareil à molette aspirant et soufflant relié par un tuyau souple à un tube de verre rodé à ses extrémités. Le premier opérateur masse l'animal en faisant glisser ses mains simultanément sur le ventre et le dos de la région pelvienne, de manière à entraîner l'éversion du cloaque et l'érection de l'organe copulateur. Celles-ci étant obtenues, il faut les maintenir en massant plus rapidement et plus fort sur le trajet des canaux déférents, à l'aide du pouce et des grands doigts de la main droite. Au bout de quelques minutes, se produit un épanchement de sperme dans le sillon médian de l'organe copulateur. Le second opérateur en recueille une certaine quantité (0,12 cm³ environ) en plaçant l'extrémité du tube de verre dans le sillon et en actionnant la molette de l'appareil. Le sperme est ensuite injecté dans les voies génitales de la femelle à l'aide du même instrument.

La femelle étant maintenue de la même façon que le mâle, le premier opérateur serre dans sa main gauche la région abdominale de l'animal afin de faire saillir légèrement le cloaque ; puis, avec le pouce et l'index de sa main droite, il exerce une pression supplémentaire de façon à obtenir une extroversion complète et la mise à découvert des orifices anal et génital. Le second opérateur introduit le tube contenant le sperme dans le vagin de la femelle et le fait pénétrer de 2,5 cm (chez la poule) ou 3,5 cm (chez la dinde) en se fiant à un repère gravé dans le verre, de manière à atteindre le fond de l'utérus. Le sperme est alors chassé lentement de la pipette grâce à une manoeuvre

de la molette. Quand tout le liquide a été chassé, le tube est retiré délicatement afin d'éviter tout reflux.

Par mesure d'asepsie, les tubes à insémination sont conservés dans l'alcool à 90° et rincés plusieurs fois à l'eau bouillie juste avant leur emploi. Cette précaution évite aussi tout mélange accidentel des spermes.

L'insémination artificielle a été pratiquée au printemps et en automne, c'est-à-dire à des époques où la fonction reproductrice (saisonnière chez le Dindon) est parfaitement active. Chez les deux espèces et dans les deux sexes, elle requiert une période de conditionnement des réflexes, plus ou moins longue suivant les individus. Les inséminations ont été tantôt hebdomadaires, tantôt bi-hebdomadaires.

Avant de changer le partenaire sexuel d'une femelle, en vue d'une nouvelle insémination ou d'un nouvel accouplement, on isole celle-ci pendant un délai suffisant pour qu'il ne subsiste plus de spermatozoïdes vivants dans son oviducte, soit pendant un mois chez la poule (NALBANDOV et CARD, 1943) et deux mois et demi chez la dinde (LORENZ, 1950).

Conduite de l'incubation

Tous les oeufs pondus ont été affectés, dès leur ramassage, d'un numéro d'identification inscrit sur la coquille et enregistré. Ils ont été conservés dans un endroit frais pendant 1 à 6 jours, puis mis à couvrir dans des incubateurs assurant une température de 39°C et une humidité relative de 60 %. L'incubateur employé pour les oeufs non expérimentés est d'un modèle courant (marque PAL), sans ventilation forcée et s'ouvrant par l'avant. Chez les oeufs expérimentés, préalablement ouverts, il est nécessaire de faire de nombreuses observations. Pour les réaliser sans ouvrir la couveuse, on a utilisé un appareil de marque CURFEW (Cambridge) muni d'un couvercle en plexiglas.

Les oeufs intacts ont été retournés deux fois par jour entre le 3^e et le 15^e jour d'incubation. Les oeufs expérimentés ont été simplement inclinés de 45° par rapport à leur plan sagittal vertical, alternativement d'un côté et de l'autre, leur ouverture étant maintenue en dessus.

B - TECHNIQUES OPERATOIRES

1) PROCESSUS GENERAL

Conditions d'asepsie

Avant, pendant et après les opérations, toutes les précautions ont été prises afin d'éviter la contamination des oeufs. Avant chaque séance, les platines des loupes et microscopes ainsi que les divers appareils sont désinfectés à l'alcool à 90°. Les instruments métalliques sont stérilisés à la flamme du bec Bunsen avant leur emploi. Les pipettes de verre et tous les objets qui ne peuvent pas être passés directement à la flamme sont conservés en permanence dans l'alcool et rincés plusieurs fois à l'eau bouillante avant d'être utilisés. Tous les récipients destinés à contenir les solutions physiologiques sont stérilisés par passage à l'autoclave, puis au four Pasteur. Les solutions elles-mêmes sont stérilisées par ébullition dans des fioles bouchées par un tampon de coton. Pour faciliter leur prélèvement, elles sont transvasées, au moment de l'emploi, dans de petits béciers que l'on recouvre de papier d'aluminium et que l'on maintient à la température de 37-38°C.

Mirage des oeufs

Les oeufs qui ne sont pas destinés à l'expérimentation sont mirés pour la première fois à 3 jours d'incubation, puis à intervalles réguliers au moyen d'un appareil fabriqué d'après les plans de HAMBURGER (1960). Les oeufs destinés à l'expérimentation sont mirés à 28 heures d'incubation, de manière à contrôler le développement de leur blastodisque. Les oeufs "clairs" et ceux dont le blastodisque paraît très petit sont écartés provisoirement. Ils sont ouverts ultérieurement afin de vérifier l'absence de fécondation au moyen de la technique de KOSIN (1944). Chez les oeufs dont le degré de développement du germe paraît conforme au temps d'incubation, on délimite d'un trait de crayon sur la coquille le contour de

l'ombre portée du blastoderme. Avec ce repère maintenu en dessus, chaque oeuf est ensuite placé dans une demi-boîte de Pétri, sur un anneau de gaze tressée qui l'empêche de rouler.

Ouverture des oeufs

Les oeufs dont le blastoderme doit être disséqué sont ouverts selon la méthode de SHUMWAY et ADAMSTONE (1958). Celle-ci consiste à découper la coquille avec des ciseaux au niveau de l'équateur, à vider l'albumen en inclinant l'oeuf et à verser le jaune dans un cristallisateur rempli de solution physiologique (NaCl à 9‰) à 37°C.

Lorsqu'il faut percer une fenêtre dans la coquille pour expérimenter sur le blastoderme ou sur l'embryon, on emploie la technique de HAMBURGER (1960) adaptée selon HARA (1961 et communication personnelle). Un coton imbibé d'alcool à 70° est passé rapidement sur la partie supérieure de l'oeuf (au niveau du blastoderme) et sur son gros bout. Dans le cercle qui a été tracé sur la coquille au moment du mirage, on inscrit un carré de 8 à 10 mm de côté, avec des diagonales. A l'aide d'une petite scie à métaux maintenue très tangentielle-ment par rapport à la coquille, on entaille à tour de rôle les côtés et les diagonales de ce carré. Les quatre incisions latérales, au niveau desquelles la coquille devra se briser net; doivent être plus superficielles que celle des diagonales. Au moyen d'une aiguille montée placée au centre du carré et faisant levier, il est alors possible de soulever à tour de rôle par leur sommet commun les quatre triangles isocèles contigus gravés sur la coquille, puis de les détacher complètement en les rabattant vers l'extérieur. La membrane coquilliè-re externe est alors apparente. Avec des pinces fines, on la débarrasse de tous les débris de coquille qui pourraient tomber de l'oeuf au moment de son ouverture, puis on y dépose une goutte de solution de Locke. Cela a pour effet de ramollir les deux membranes coquillières et de permettre leur décollement du blastoderme sous-jacent. On perce ensuite la chambre à air située au gros bout de l'oeuf au moyen d'une aiguille d'acier ; cette opération, en supprimant la pression

du gaz enclos entre les deux membranes coquillières sur l'albumen et le jaune, permet à ceux-ci de s'affaïsser instantanément lors de la perforation des membranes au niveau de la fenêtre. Cet affaïssement met le blastoderme et la membrane vitelline qui le recouvre à l'abri de toute lésion. Les membranes coquillières obturant la fenêtre peuvent alors être percées et déchirées ensemble à l'aide de précelles manoeuvrées délicatement. Les bords de la fenêtre peuvent être utilisés comme couperets pour sectionner les lambeaux de membranes. Le blastoderme, situé au pôle animal du jaune, est dès lors accessible.

Lorsqu'on pratique une opération, il peut être avantageux de faire remonter l'embryon au niveau de la fenêtre. Il faut pour cela instiller dans l'oeuf du Locke à 37°C jusqu'à ce que le jaune, qui est moins dense que l'albumen, vienne buter contre les bords de la fenêtre. Après l'opération, il suffira d'aspirer par la perforation faite au gros bout de l'oeuf la quantité de liquide nécessaire pour faire redescendre le jaune à sa position initiale.

Détermination des stades embryonnaires

Avant chaque intervention, comme avant chaque fixation, le stade de développement des embryons de Poulet est déterminé avec précision au moyen de la table de HAMBURGER et HAMILTON (1951). On a fait suivre le numéro de chaque stade des initiales HH et dans le cas de stades intermédiaires du signe + ou -, conformément aux instructions données par les auteurs. Dans le cours de ce travail, lorsqu'un stade est cité pour la première fois, on a souvent mentionné sa caractéristique principale (pour les stades jeunes, notamment) et le temps d'incubation correspondant, afin de le situer immédiatement dans l'esprit du lecteur. Pour le Dindon, aucune table n'existait au départ, mais l'étude des embryons de cette espèce m'a permis de constater que tous les stades de HAMBURGER et HAMILTON (1951) pouvaient être retrouvés dans son développement, avec des différences peu nombreuses et d'ordre essentiellement quantitatif par rapport au Poulet. En outre, des courbes de développe-

ment ont été établies chez les deux espèces afin de connaître les temps d'incubation nécessaires pour atteindre les différents stades (REYNAUD, 1972).

Soins postopératoires

Lorsque l'expérimentation *in ovo* est terminée, la fenêtre qui a été percée dans la coquille de l'oeuf est fermée au moyen de papier adhésif transparent. Deux carrés de ce papier sont découpés, dont l'un doit avoir la même surface que la fenêtre, et l'autre une surface un peu plus grande. Ces deux morceaux sont appliqués l'un contre l'autre, colle contre colle, de façon à ne laisser dépasser qu'une marge adhésive de 1 ou 2 mm qui fixera l'ensemble sur le pourtour de la fenêtre. Ce dispositif est destiné à empêcher tout contact de l'albumen et de la membrane chorio-allantoïdienne avec la face collante du papier adhésif. Pour éviter la pénétration de micro-organismes à l'intérieur de l'oeuf, il faut veiller à ce que l'adhérence du papier à la coquille soit parfaite. Si du liquide s'est répandu sur les bords de la fenêtre, la coquille doit être essuyée soigneusement avec des morceaux de papier filtre. Si des plis ou des cloques se forment néanmoins, au moment de la pose du papier adhésif, il faut les aplatir en les pressant avec les bords d'une aiguille chauffée modérément. Une fois refermé, chaque oeuf est replacé dans l'incubateur avec son support de gaze qui l'immobilise et maintient sa fenêtre dirigée vers le haut.

Dans les oeufs opérés à 28 heures d'incubation, le blastoderme et l'embryon (non encore protégé par ses annexes) sont surmontés par une couche d'air de quelques millimètres qui peut entraîner leur dessiccation. Tant que l'embryon n'est pas entièrement recouvert par l'ammios - c'est-à-dire pendant les 24 heures suivantes - on prend soin de l'humecter trois ou quatre fois, à intervalles de temps réguliers. Cela se fait en introduisant quelques gouttes de Locke à 37°C par la fenêtre, après décollement partiel du papier qui l'obture.

Dans certains lots d'oeufs expérimentés parvenus en fin d'incubation, on a augmenté les pourcentages d'éclosion en vaporisant à

plusieurs reprises de l'eau tiède sur les coquilles et quelquefois même sur les poussins, après retrait du papier fermant la fenêtre. Enfin, quand l'éclosion tarde trop, on brise délicatement la coquille là où elle cède habituellement aux coups de bec du poussin.

2) DIFFERENTS TYPES D'INTERVENTIONS

a) Irradiation du croissant germinal aux rayons ultraviolets

La technique utilisée est inspirée de celle de BENOIT (1930 a,b) qui fut le premier à mettre au point un procédé d'irradiation du croissant germinal aux rayons ultraviolets, en vue de la destruction des CGP.

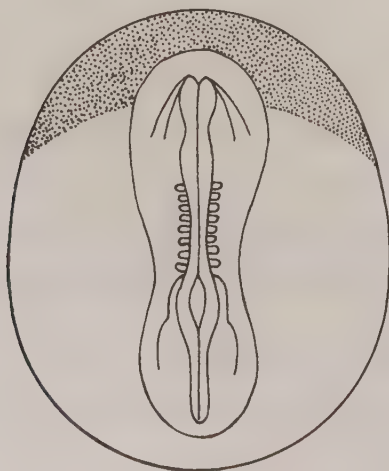
Caractéristiques de l'appareil à rayons ultraviolets

La source d'ultraviolet est constituée par une lampe à vapeur de mercure (type S 100 de marque LEITZ), montée sur socle et pouvant à la fois coulisser le long d'un axe vertical et tourner autour d'un axe horizontal. Le faisceau lumineux, canalisé par un tube en laiton de 1 cm de diamètre et de 15 cm de longueur raccordé à la lampe, peut donc être orienté à volonté de façon à toujours frapper perpendiculairement le blastoderme. Sur son trajet, un diaphragme ménage une ouverture rectangulaire plus ou moins grande, permettant de délimiter avec précision le territoire à irradier. L'appareil est complété par un compartiment à filtres et un obturateur muni d'un déclencheur souple. On a utilisé le plus souvent un filtre UG 5 de 2 mm d'épaisseur (LEITZ) transmettant toutes les longueurs d'onde comprises entre 2540 et 4050 Å. Cette bande est intéressante car elle comporte à la fois des rayons ultraviolets de petite longueur d'onde ($\lambda < 3000$ Å) à action délétère puissante et quelques radiations violettes ($\lambda > 4000$ Å) permettant de voir et de diriger le faisceau lumineux. Dans la première série expérimentale, quelques irradiations ont été faites au moyen de la combinaison des filtres UG 11 et Hg 312 donnant une raie monochromatique ($\lambda = 3120$ Å).

Ecrans

Afin de détruire par les rayons X les CGP contenues dans le croissant germinale, DUBOIS (1962) a mis au point un dispositif protecteur à deux écrans de plomb, (un plein, un évidé) dont je me suis inspiré pour la confection d'écrans en aluminium.

Ces écrans sont fabriqués en calquant le contour d'un territoire incluant largement le croissant germinale sur des embryons de stade 9⁺ HH (8 somites, *fig.1*) montés au baume entre lame et lamelle après fixation et coloration *in toto* suivant la technique de SHUMWAY et ADAMSTONE (1958). On utilise ensuite les calques obtenus pour tailler le papier d'aluminium. Les croissants germinaux de mêmes stades n'ayant pas toujours des surfaces rigoureusement égales, on prévoit deux jeux d'écrans correspondant aux dimensions maximales et minimales rencontrées. Le premier écran est constitué par une bande de papier évidée en son milieu sous forme de demi-cercle (+ 8 mm de diamètre). Une partie saillante médiane est destinée à couvrir l'extrémité céphalique de l'embryon pour la protéger des rayons ultraviolets. Le second écran, prévu pour renforcer cette protection, est une simple languette triangulaire d'environ 5 mm de largeur à sa base. Au moment de l'irradiation, il est posé à plat sur le premier écran de façon que la languette déborde de tous côtés la partie saillante qui couvre la tête de l'embryon (*fig.2*).



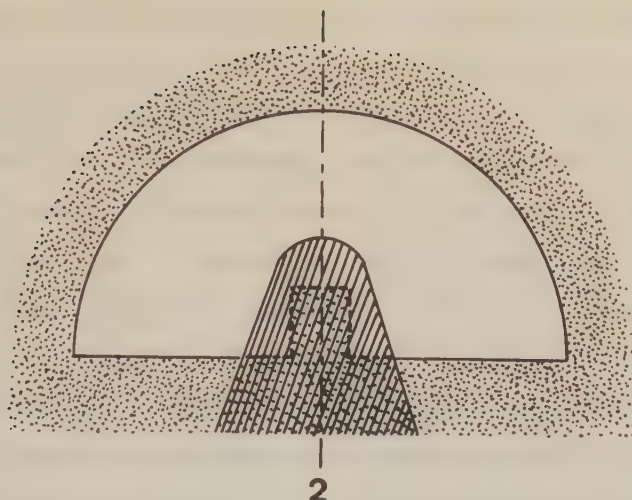


Fig.1 - Schéma d'un embryon de Poulet au moment où se pratique l'irradiation du croissant germinal (stade 9+ HH, 8 somites). En pointillé : le croissant germinal.

Fig.2 - Système des écrans de papier d'aluminium utilisés pour l'irradiation. En pointillé : écran évidé ; en hachures : écran plein en forme de languette (D'après DUBOIS, 1962).

Dispositif expérimental

Après avoir repéré le blastoderme par mirage, on perce à son niveau une fenêtre dans la coquille de l'oeuf selon la technique décrite plus haut. Puis, autour de cette fenêtre, on place un anneau en matière plastique de 15 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur, dont l'une des faces a été enduite de vaseline pour rendre étanche sa zone de contact avec la coquille. On instille ensuite dans l'oeuf du Locke à 37°C jusqu'à ce que le niveau du liquide affleure la face supérieure de l'anneau. Le jaune tend à venir flotter à la surface, mais son ascension est arrêtée par les bords de la fenêtre qui encadrent alors une large portion du blastoderme. Si, par hasard, celle-ci n'inclut pas la région du croissant germinal, il suffit de faire pivoter légèrement

l'oeuf autour de son axe pour la faire apparaître. L'oeuf étant ensuite maintenu rigoureusement immobile, on contrôle le stade embryonnaire au moyen d'une loupe binoculaire. S'il est convenable (8^+ à 10 HH), on pose sur l'anneau le premier écran en papier d'aluminium que l'on oriente de telle manière que son ouverture coïncide exactement avec le territoire à irradier. Le second écran est ensuite glissé correctement sur le premier (voir ci-dessus). Puis, le tube du générateur d'ultraviolet est amené au-dessus de l'oeuf, perpendiculairement par rapport au plan de la fenêtre. Il est ajusté de telle sorte que son ouverture couvre entièrement la partie exposée du blastoderme. Dès lors, à condition que l'appareil fonctionne depuis plus d'un quart d'heure pour être à son plein rendement, on peut procéder à une irradiation en manoeuvrant l'obturateur et, si nécessaire, le diaphragme.

Doses d'ultraviolet administrées

La distance de la source d'ultraviolet au sujet étant maintenue constante (30 cm) de même que toutes les autres caractéristiques de l'appareil, la seule variable indépendante, en dehors de l'utilisation des filtres, est la durée de l'irradiation. Chez les embryons de 28 heures choisis pour l'expérimentation (stade 8^+ à 10 HH), il s'est avéré que la mort intervenait constamment dans de brefs délais après une irradiation totale (sans écran) du blastoderme pendant 3 minutes. Pour les irradiations localisées à la région du croissant germinale (avec écrans), la survie embryonnaire paraissant compatible avec une exposition prolongée, on a administré les rayons ultraviolets pendant 4 à 11 minutes, ce qui correspond en partie aux doses utilisées par BENOIT (1930 a, b).

b) Séparation des feuillets blastodermiques

La séparation des feuillets blastodermiques aux stades de la ligne primitive (4 HH) et du prolongement céphalique (5 HH) a été

réalisée *in vitro* selon la technique élaborée par NIEUWKOOP (travaux non publiés) et HARA (1961).

Prélèvement du blastoderme

Après ouverture aux ciseaux de la coquille de l'oeuf et élimination de l'albumen (voir plus haut), le jaune est transféré dans un cristalliseur contenant une solution physiologique (NaCl à 9‰) à 37°C. Avec des ciseaux à iridectomie, on découpe ensuite simultanément le pourtour du blastoderme et la membrane vitelline qui le recouvre, de façon à les détacher complètement du reste du jaune. Au moyen d'une pipette à pavillon à large ouverture (5 mm de diamètre), on transporte ensuite le blastoderme dans un verre de montre contenant un fond d'agar-agar (à 2 %) solidifié, et rempli de Locke sans calcium qui facilitera la séparation des feuillets germinaux. Sous la loupe binoculaire, on contrôle l'orientation du blastoderme et son stade de développement. Si la membrane vitelline ne s'est pas séparée spontanément du blastoderme au moment de son excision, on la détache avec des brucelles et on dispose le blastodisque avec son endoblaste en dessus. A l'aide d'une micropipette, on évacue, si nécessaire, les particules vitellines qui se répandent dans la solution de Locke. Puis, au moyen d'un paire d'aiguilles montées très fines, on coince solidement le pourtour du blastoderme dans le substrat d'agar, en le dentelant régulièrement, pour maintenir la surface de l'endoblaste parfaitement lisse et tendue.

Isolement de l'endoblaste

Cette microdissection se fait à l'aide d'une paire d'aiguilles de tungstène extrêmement fines, dégrossies par abrasion et affûtées par des immersions répétées dans un bain de salpêtre (KNO_3) en fusion. On commence par inciser l'endoblaste au niveau du bord convexe (antérieur) du croissant germinal car cette zone, située juste au-delà de la jonction entre les aires opaque et pellucide, comporte un système

de poches ("endodermal loops" de CLAWSON et DOMM, 1969) permettant une pénétration contrôlée des aiguilles jusqu'à l'ectoblaste. On prolonge ensuite l'incision vers l'arrière tout en faisant pénétrer l'une des aiguilles tangentiellement sous le bord libre de l'endoblaste pour rompre, de proche en proche, toutes ses adhérences ; la seconde aiguille, en rabattant les parties réséquées, contribue à parfaire leur isolement (*fig.3*).

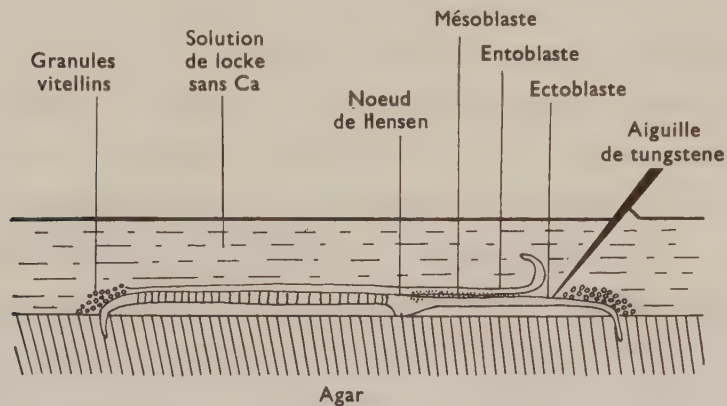


Fig. 3 - Isolement de l'endoblaste dans la région du croissant germinal, au stade du prolongement céphalique (5 HH). Schéma d'une section sagittale passant par la ligne primitive (D'après HARA, 1961).

Cette technique est utilisée dans deux buts différents.

Elle permet d'isoler le feuillet profond au stade de la ligne primitive (4 HH) afin de le traiter *in toto* pour localiser les CGP. Dans ce cas, on incise l'endoblaste en suivant le contour de l'aire pellucide et on l'isole ensuite en progressant vers le centre du blastoderme. Il faut préciser cependant que le mésoblaste présent autour de la ligne primitive adhère si fortement à l'endoblaste qu'il est généralement entraîné avec lui au cours de la dissection. Une fois

isolé, le feuillet profond (endomésoblaste) est éloigné de l'ectoblaste tout en étant maintenu immergé dans la solution de Locke. Il peut alors être étalé sur une lamelle de verre en vue de subir un traitement histologique (voir plus bas et REYNAUD, 1967).

Cette technique est également employée pour isoler le croissant germinal au stade du prolongement céphalique (5 HH) afin de recueillir les CGP destinées aux transferts.

Dans ce cas, on limite l'incision de l'endoblaste à la région pré-céphalique en essayant de suivre le contour du croissant germinal. Ses deux feuillets constitutifs sont ensuite séparés aisément parce que le mésoblaste extra-embryonnaire ne s'est pas encore infiltré entre eux. L'endoblaste qui contient les CGP est seul conservé afin d'être dissocié.

c) Dissociation cellulaire de l'endoblaste du croissant germinal

WEISS et ANDRES (1952) ont introduit une technique de dissociation mécanique en milieu agité valable pour les embryons de Poulet entiers jusqu'à 2 jours d'incubation et pour les fragments d'embryons jusqu'à 9 jours. J'ai repris cette technique en remplaçant simplement le broyage initial des tissus par leur dilacération en milieu acalcique.

L'endoblaste du croissant germinal est dilacéré en plusieurs petits fragments de même taille au moyen d'une micro-aiguille de verre. Ceux-ci sont ensuite transportés, à l'aide d'une pipette de SPEMANN, dans un petit verre de montre ou dans la cupule d'une lame de MAXIMOV contenant une goutte de Locke sans calcium (soit environ 5 mm³). En aspirant et en refoulant successivement et à plusieurs reprises ces fragments d'endoblaste avec des micropipettes à calibre de plus en plus restreint, on obtient assez facilement leur désagrégation. Ces opérations, faites sous contrôle de la loupe binoculaire, doivent aboutir à la formation d'une suspension homogène de fines particules opalescentes. A tout moment, on peut contrôler au microscope le degré

de dispersion cellulaire sur des échantillons de solution placés sur une lame de verre. Si la dissociation n'est pas suffisante, c'est-à-dire si plusieurs agrégats de cellules persistent, on l'achève grâce à de nouvelles suctions du matériel qui a décanté dans la cupule. Lorsque la suspension cellulaire est bien homogène, on en prélève un nouvel échantillon qui est réservé à l'étude cytologique (voir plus bas). Si la suspension cellulaire ne peut pas être utilisée immédiatement, on peut la conserver pendant deux ou trois heures dans une chambre humide stérile (boîte de Pétri tapissée de papier filtre) que l'on place dans une étuve à 37°C ; au-delà de ce délai, elle devient inutilisable en raison de la réagrégation des cellules.

d) Injection des cellules dans le réseau vasculaire vitellin

La technique qui a été employée s'inspire encore largement de celle élaborée par WEISS et ANDRES (1952) pour l'injection de cellules embryonnaires dissociées dans la circulation sanguine de l'embryon de Poulet.

L'appareil à injection se compose d'une aiguille de verre portée par un mandrin métallique creux relié à un tuyau souple. Celui-ci peut être pincé à différents niveaux par une molette enrouleuse et dérouleuse qui permet d'aspirer et de refouler de très faibles quantités de liquide ("clinac pipeter" de marque GOLDBERG). L'aiguille, en verre Pyrex, est fabriquée suivant une technique due à J. FABER (communication personnelle) : elle est coudée à son extrémité et elle doit posséder une pointe biseautée très aiguë de 30 à 40 μ de diamètre d'ouverture. Après aspiration de quantités jaugées de liquide, des repères peuvent être tracés à sa surface, correspondant à des volumes de 0,5 à 1 mm³, par exemple.

L'injection se pratique dans une veinule du réseau vasculaire vitellin qui est bien développé et facilement accessible chez des sujets de 3 à 4 jours d'incubation.

Les opérations de prélèvement et d'injection se font sous le

contrôle constant de la loupe binoculaire. Après avoir ramené le blastoderme au niveau de l'ouverture de l'oeuf et avoir déposé à sa surface une grosse goutte de Locke pour empêcher sa dessiccation, on repère un vaisseau vitellin approprié à l'injection. Pour éviter une hémorragie importante, il vaut mieux choisir une veinule de petit diamètre (50μ environ).

On aspire ensuite dans l'aiguille une petite fraction (le $1/10^{\text{e}}$ environ) de la suspension cellulaire obtenue par dissociation du croissant germinal, qu'on a pris soin d'homogénéiser auparavant par agitation. En employant le grossissement maximum de la loupe, on introduit alors d'un mouvement vif et précis, la pointe de l'aiguille dans la lumière du vaisseau sanguin préalablement choisi, en veillant à ne pas insuffler de bulles d'air. L'injection de la suspension cellulaire est ensuite faite sous une pression modérée et régulière, en manoeuvrant délicatement la molette du "clinac pipeter". Souvent, on peut repérer dans la veinule la traînée opalescente du matériel injecté qui progresse et se disperse rapidement sous l'effet du courant sanguin. On limite l'injection à un volume de $0,5 \text{ mm}^3$ car des doses supérieures se sont montrées létales pour des embryons de 3 à 4 jours d'incubation dont le volume sanguin total est de 50 mm^3 seulement (RYCHTER, KOPECKY et LEMEZ, 1955). Une fois l'injection terminée, l'aiguille de verre est retirée délicatement et sans à-coup pour ne pas déchirer la paroi vasculaire et la membrane vitelline sus-jacente. La même aiguille peut être utilisée pour plusieurs injections, tant qu'elle n'est pas émoussée ou bouchée. Après chaque utilisation, on la nettoie par aspirations et rejets répétés d'eau bouillante.

C - TECHNIQUES D'HISTOLOGIE ET D'HISTOCHIMIE

Mes travaux étant consacrés à l'étude des cellules de la lignée germinale et de leur entourage, les examens cellulaires et tissulaires se sont limités au croissant germinale du blastoderme, aux régions gonadiques de l'embryon et à l'appareil génital de l'adulte. Ils ont nécessité l'emploi de techniques différentes suivant le stade de maturation des gonocytes et l'âge des sujets morts ou sacrifiés à fin d'examen.

1°/ Pour l'étude des cellules germinales au-delà du 6^e jour d'incubation, il n'existe aucune coloration sélective chez le Poulet : on a donc utilisé une technique histologique courante. Chez les adultes et les embryons de plus de 12 jours, on dissèque au préalable l'organisme de façon à ne conserver que certains organes (gonade, gonoducte) ou ébauches d'organes (ensemble du mésonephros et de l'ébauche gonadique). Ces éléments, après avoir été rincés dans du Locke, sont fixés au Bouin (pendant 24 à 48 heures suivant leur taille), lavés, déshydratés, inclus dans la celloïdine puis dans la paraffine, et enfin débités au microtome en coupes sériées transversales de 5 ou 7,5 μ d'épaisseur. Les coupes sont ensuite étalées sur lames et colorées à l'hémalum de MAYER, ou à l'hématoxyline-éosine, ou encore selon la technique trichromique de P. MASSON. Ces procédés ont été également employés pour le traitement d'embryons plus jeunes (7 à 12 jours) fixés et inclus *in toto*, mais dont la région gonadique seule a été débitée en coupes transversales.

2°/ Chez les embryons de moins de 7 jours d'incubation, les gonocytes primaires peuvent être facilement repérés par une technique histo-chimique. Ils renferment en effet du glycogène qui a été mis en évidence par MINTZ (1960) et MEYER (1960) grâce à la coloration au

PAS (Periodic Acid Schiff), accompagnée d'un test de prédigestion à la ptyaline ou à la maltase. Cette technique, appliquée à des coupes histologiques (CLAWSON et DOMM, 1963), à des embryons entiers (MEYER, 1964) et à des frottis sanguins (SINGH et MEYER, 1967) a permis de suivre la destinée des gonocytes depuis leur entrée dans le courant sanguin jusqu'à leur installation dans les ébauches gonadiques. Elle s'est avérée valable chez le Dindon comme chez le Poulet mais elle n'est plus utilisable après le 6^e jour d'incubation (stade 28 HH) par suite de la disparition du glycogène à l'intérieur des gonocytes (CLAWSON et DOMM, 1963 ; MEYER, 1964).

Les embryons sont fixés *in toto* au Gendre à 4°C pendant une nuit, rincés plusieurs fois à l'alcool à 95°, et traités ensuite selon le procédé fourni par MEYER (1960) pour l'application du PAS aux embryons entiers :

- oxydation à l'acide periodique tamponné 20 minutes
- lavage à l'eau distillée 10 "
- réactif de Schiff 30 "
- lavage à l'eau courante 20 "

Ce procédé de coloration dans la masse est d'autant plus intéressant qu'avant le stade 28 HH, les ébauches gonadiques sont très petites et difficiles à disséquer. Après déshydratation et inclusion des embryons dans la celloïdine et dans la paraffine, des coupes sérieées transversales de 5 ou 7,5 μ d'épaisseur sont faites dans une région du tronc incluant très largement les ébauches gonadiques. Certaines coupes ont été contrastées, sur lame, à l'hématoxyline au dioxane qui colore les noyaux.

3°/ La technique au PAS peut également servir à la mise en évidence des cellules germinales primordiales contenues dans le croissant

germinal extra-embryonnaire (REYNAUD, 1967 ; CLAWSON et DOMM, 1969). J'ai personnellement adapté la technique de MEYER (1960) de sorte qu'elle puisse être appliquée directement au feuillet germinal qui contient les CGP.

Le feuillet profond du blastoderme, qui a été prélevé *in toto* ou dans la seule région du croissant germinal, puis étalé sur une lamelle de verre à laquelle il adhère par capillarité (voir plus haut), est plongé dans le mélange fixateur de GENDRE, à 4°C, pendant 8 à 10 heures, puis rincé à l'alcool à 95°. On lui applique ensuite le même traitement qu'aux embryons entiers (cf. ci-dessus), mais en réduisant la durée des différents bains de la façon suivante, compte tenu de la minceur du matériel :

- acide periodique	10 minutes
- eau distillée	5 "
- réactif de Schiff	20 "
- eau courante	15 "

Après déshydratation progressive, la préparation est montée directement au baume du Canada, la lamelle portant l'endoblaste étant retournée sur une lame de verre passée au xylol. Cette technique est utilisable pour la coloration *in toto* du feuillet profond aux stades de la ligne primitive (4 HH) et du prolongement céphalique (5 HH) ; pour la coloration de l'endoblaste du croissant germinal seul, elle peut être employée jusqu'au stade de 7 somites (9 HH).

D - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

1) COLORATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Des échantillons de la suspension cellulaire obtenue par désagrégation de l'endoblaste du croissant germinale (au stade 5 HH) sont déposés sur des lamelles de verre. Ces gouttes sont séchées aussitôt dans un courant d'air chaud, puis les lamelles qui les portent sont immergées dans le mélange fixateur du GENDRE, à 4°C, pendant 1 heure ou 2.

Ces préparations, qui ont un rôle de témoin dans les expériences de prélèvement et d'injection de cellules, sont ensuite traitées selon la technique au PAS adaptée pour la coloration des feuillettes germinales (voir ci-dessus).

D'autre part, des échantillons de sperme de volailles adultes ont été également recueillis (cf. la technique d'insémination artificielle), et déposés sur des lames de verre en vue de leur coloration élective par le liquide de CORIN et STOCKIS (solution ammoniacale d'érythrosine) et le bleu de méthylène.

2) MESURES CELLULAIRES

Afin de pouvoir distinguer les gonocytes de Dindon de ceux du Poulet, on a mesuré leurs diamètres cytoplasmique et nucléaire respectifs à deux périodes de leur évolution, correspondant à deux localisations différentes : 1°) dans le croissant germinale, où ils sont représentés par les CGP, et 2°) dans les ébauches gonadiques, où ces cellules prennent le nom de gonocytes primaires dès l'instant de leur fixation.

Les mesures ont été faites à l'aide d'un micromètre oculaire permettant d'apprécier le 1/10^e de micron. Pour l'étude des CGP

présentes dans les croissants germinaux étalés *in toto* sur lamelle de verre, on a mesuré indifféremment toutes les cellules ayant les caractéristiques de CGP : inclusions PAS +, grande taille, gros noyau. L'étude des gonocytes primaires présents dans les ébauches gonadiques a été faite sur des coupes transversales de $7,5\mu$ chez le Poulet et de 10μ chez le Dindon, épaisseurs minimales garantissant que les gonocytes correspondants ne sont pas sectionnés plus de deux fois. On n'a évidemment mesuré que les grosses cellules montrant leur noyau et dotées de granules de glycogène dans leur cytoplasme. Chez les deux espèces, les diamètres cellulaire et nucléaire ont été mesurés pour une cinquantaine de cellules. On a déterminé les modes (ou dominantes) de ces diamètres, c'est-à-dire les valeurs les plus fréquemment rencontrées au cours des 4 séries de mesures. Leurs moyennes arithmétiques ont été enfin calculées et utilisées pour établir le rapport nucléoplasmique linéaire

$$\left(\frac{\text{diamètre nucléaire}}{\text{diamètre cytoplasmique}} \right)$$

des gonocytes de Poulet et de Dindon, qui peut être considéré comme une constante spécifique jusqu'à la transformation des gonocytes primaires en gonies.

3) DENOMBREMENTS CELLULAIRES

Des dénombrements de cellules germinales ont été faits dans les ébauches gonadiques, dans le croissant germinal et dans les échantillons de suspensions cellulaires provenant de la dissociation de celui-ci. Dans les deux derniers cas, il est assez facile de procéder à un comptage intégral précis des gonocytes primordiaux parce qu'ils sont entiers et encore peu nombreux. Sur les coupes d'ébauches gonadiques, il est plus difficile de recenser avec précision les gonocytes primaires parce qu'ils sont sectionnés et qu'ils commencent à proliférer.

Pour éviter de compter plusieurs fois les mêmes cellules sectionnées à différents niveaux, on a pris soin d'utiliser les coupes les plus épaisses (7,5 ou 10 μ), de les examiner à fort grossissement ($\times 800$) et de ne dénombrer que les gonocytes qui présentaient à la fois leur noyau et un diamètre cellulaire normal (connu grâce aux précédentes mesures). Le comptage intégral des gonocytes primaires, portant sur la série complète des coupes des gonades droite et gauche du même embryon, a été possible jusqu'au 8^e jour d'incubation (stade 34 HH) seulement. Pour des stades plus avancés, on a simplement estimé la densité des gonocytes ou des gonies dont les nombres atteignent rapidement des dizaines de milliers (HUGHES, 1963).

En dehors des comptages effectués chez des embryons de Poulet et de Dindon normaux (qui tiennent lieu de témoins), on a aussi recensé les cellules germinales d'embryons de Poulet soumis à un traitement destiné à détruire ces éléments (par irradiation) ou à en introduire de nouveaux (par injection). Les dénombrements, qui n'ont intéressé que les gonocytes primaires, ont été faits dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les nombres obtenus chez les sujets irradiés, confrontés aux valeurs normales trouvées chez les témoins, ont permis d'établir leur index de stérilité.

Si N est le nombre moyen de gonocytes d'un embryon normal et X le nombre de gonocytes trouvés chez un embryon irradié de même stade, l'index de stérilité de celui-ci est donné par la formule :

$\frac{N - X}{N}$. La stérilisation sexuelle est d'autant plus poussée que l'index

obtenu est plus proche de l'unité (si $X = 0$, $\frac{N - X}{N} = 1$). De même,

chez les sujets injectés, après avoir été irradiés, on pourra établir des index de repeuplement germinal donnés par les formules : $\frac{Y}{N}$ et $\frac{Y}{N'}$,

dans lesquelles Y est le nombre de gonocytes des sujets expérimentés, N celui d'un hôte-témoin et N' celui d'un donneur-témoin.

E - SIGLES ET NOMENCLATURE

Afin d'alléger le texte, tout en faisant apparaître clairement la constitution des sujets expérimentés pour les distinguer des sujets normaux (et des hybrides), notamment dans les expériences de croisements, j'ai utilisé une série de sigles dont voici la nomenclature :

Sujets	Espèce	Race ou origine	Souche	Phénotype (traits dominants)	Sigle utilisé
Normaux	<u>Meleagris gallopavo</u>	Petit Blanc de Beltsville (PBB)	Bétina	Dindon à plumage blanc	M
	<u>Gallus domesticus</u>	quelconque		Poulet	G
Hybrides		Coq x Dinde			GM
		Dindon x Poule			MG
Expérimentés (transferts interspécifiques de CGP)	<u>Gallus</u>	porteur de germen <u>Meleagris</u>		Poulet	M(g)
Normaux	<u>Gallus domesticus</u>	Rhode Island Red (RIR)	M ₄₄	- crête simple - plumage rouge brun foncé, noir au bout des ailes et de la queue	R
		Wyandotte blanche (WB)	M ₁₁	- crête rosacée - plumage blanc	W
		Métis (F ₁) : RIR♂ x WB♀	M ₄₁	- crête rosacée ♂ : plumage blanc et noir ♀ : plumage rouge brun et noir	RW
		Métis (F ₁) : WB♂ x RIR♀	M ₁₄	- crête rosacée - plumage blanc et noir	WR
Expérimentés (transferts intraspécifiques de CGP)	<u>Gallus domesticus</u>	RIR porteur de germen WB		idem à RIR	W(r)
		WB porteur de germen RIR		idem à WB	R(w)

CHAPITRE I

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE REMPLACEMENT DES CGP

INTRODUCTION

Les nombreuses études descriptives et expérimentales consacrées aux CGP de Poulet, en fournissant les moyens de les reconnaître et de les localiser avec précision, permettent d'envisager la possibilité de leur remplacement par des cellules homologues d'origine étrangère. SWIFT (1914) a découvert que les CGP sont regroupées, au stade de la ligne primitive (4 HH), dans une aire extra-embryonnaire du blastoderme - *le croissant germinale* - dont les pointes flanquent l'extrémité céphalique de l'embryon. Ces cellules, qui occupent le feuillet endoblastique de ce territoire, s'en détachent ensuite pour passer dans les lacunes mésoblastiques, s'incorporent aux îlots sanguins en formation puis, quand la circulation s'établit, sont transportées par le sang jusqu'au niveau des ébauches gonadiques. Le croissant germinale a été décrit sous différents rapports (histologique, ultrastructural, biochimique) par plusieurs auteurs (WOODGER, 1925 ; RICHARDS, HULPIEU et GOLDSMITH, 1926 ; GOLDSMITH, 1928 ; DUBOIS et CUMINGE, 1968 ; CLAWSON et DOMM, 1969) et a été retrouvé chez d'autres espèces d'Oiseaux telles que le Moineau (BLOCKER, 1933), le Canard (ROGULSKA, 1968 ; FARGEIX, 1969) et le Dindon (REYNAUD, 1967).

L'existence d'un territoire extra-embryonnaire contenant toutes les cellules de la lignée germinale constitue une situation favorable à la stérilisation précoce qui a été réalisée par des techniques très diverses de destruction du croissant germinale telles que l'ablation (REAGAN, 1916), la cautérisation (DANTCHAKOFF, 1931, 1932), l'irradiation aux rayons ultraviolets (BENOIT, 1930 a et b), aux rayons γ (DULBECCO, 1946 ; MARIN, 1959), aux rayons X (DUBOIS, 1962) et au laser (MIMS et Mc KINNELL, 1971). Les techniques d'ablation et de cautérisation sont peu précises et se soldent par une mortalité embryonnaire très forte, due à l'épanchement du vitellus dans le premier cas

et à la dénaturation des protéines dans le second. Il paraît donc préférable de s'adresser aux techniques d'irradiation. Les rayons X sont efficaces mais leur maniement est assez délicat. De plus, la destruction totale des CGP nécessite l'emploi de doses très fortes (10 000 à 15 000 roentgens) qui ne permettent pas la survie de l'embryon au-delà du 5^e jour d'incubation (DUBOIS, 1962). Il vaut donc mieux utiliser les rayons ultraviolets dont le maniement est très simple et qui peuvent fournir une stérilisation complète tout en étant moins nocifs pour l'embryon (BENOIT, 1930 a,b).

La greffe *in situ* d'un croissant germinale, en vue de remplacer celui qui a été détruit par ablation ou cautérisation, a été envisagée par REAGAN (1916) et DANTCHAKOFF (1929) mais n'a jamais été réalisée. Cela s'explique parce qu'il est très difficile de greffer un fragment de blastoderme, très mince et très délicat, à l'intérieur d'un autre blastoderme qui repose sur du vitellus fluide. En outre, le site de transplantation est souvent trop endommagé pour se prêter normalement à la prise d'une greffe. Récemment, KOMAR (1969) a transplanté des croissants germinaux sur la chorio-allantoïde d'embryons de 7 jours d'incubation et a constaté que quelques CGP se retrouvaient ensuite dans les vaisseaux sanguins du greffon. Ces cellules auraient pu passer dans le réseau vasculaire de l'hôte mais n'auraient pas pu coloniser ses ébauches gonadiques déjà différenciées et pourvues en gonocytes. ROGULSKA (1969) a réussi à implanter des portions de croissant germinale dans la cavité coelomique, à proximité des crêtes génitales, au stade où elles sont encore stériles. Les CGP contenues dans les greffons ont émigré directement et rapidement dans l'épithélium germinatif de l'hôte. Cependant, l'exiguïté du coelome embryonnaire ne permettant d'introduire au contact des ébauches gonadiques qu'un petit fragment de croissant germinale, le nombre de gonocytes transférés était généralement inférieur à 20.

Au lieu de procéder à une greffe de croissant germinale pour remplacer les CGP, on peut essayer de les échanger plus tard, au moment de leur migration intravasculaire, en ayant recours à une technique de parabiose

circulatoire. SIMON (1960 a) a obtenu le transfert de gonocytes primordiaux entre deux embryons en associant par leur aire vasculaire un blastoderme intact et un blastoderme de même stade (10 à 13 HH) amputé du croissant germinale. Malheureusement, cette parabiose ne peut se faire qu'*in vitro* et les embryons ne se développent que pendant deux ou trois jours. La parabiose *in vivo* entre deux embryons d'Oiseau n'est possible que par l'intermédiaire de leur membrane chorio-allantoïdienne, à partir du moment où elle est bien vascularisée (stade 32 HH) (HASEK, 1953). Ce stade est alors trop tardif pour permettre le transfert des CGP qui ne sont plus présentes dans le sang au-delà du stade 19 HH (SINGH et MEYER, 1967). Pour l'obtenir, on devra donc introduire les CGP dans le réseau vasculaire vitellin qu'elles empruntent normalement, en opérant à une époque où les ébauches gonadiques de l'hôte sont encore compétentes, c'est-à-dire capables de capter les gonocytes. Ce transfert nécessitera d'abord la dissociation cellulaire du croissant germinale du donneur pour mettre ses CGP en suspension dans du liquide, puis l'injection dans la circulation vitelline de l'hôte de la suspension cellulaire ainsi obtenue.

On a exposé plus haut les raisons qui justifient la réalisation préliminaire de transferts interspécifiques des gonocytes. Cette opération paraît tout-à-fait possible puisqu'elle a déjà été réussie. SIMON (1960 a) a obtenu grâce à la parabiose *in vitro* la colonisation d'ébauches gonadiques de Poulet par des CGP de Canard, reconnaissables grâce à leur rapport nucléoplasmique. Plus tard, ROGULSKA, OZDZENSKI et KOMAR (1971), après avoir greffé dans le coelome d'embryons de Poulet des fragments d'intestin embryonnaire de Souris contenant des CGP, bien repérables grâce à leur activité phosphatase alcaline, ont également constaté leur migration vers les crêtes génitales de l'hôte, ce qui démontre l'intervention d'un phénomène d'attraction entièrement dépourvu de spécificité zoologique.

En résumé, la technique de substitution des gonocytes primordiaux devra comporter les deux phases suivantes : 1°/ la stérilisation de l'hôte par irradiation aux rayons ultraviolets de son croissant germinale, 2°/ le transfert, par injection intravasculaire à l'hôte stérilisé, des CGP du donneur recueillies par dissociation de son croissant germinale *in vitro*.

A - STERILISATION DE L'HOTE

1) METHODE EXPERIMENTALE

Les CGP sont regroupées dans le croissant germinale entre les stades 4 et 10 HH. C'est donc pendant cette période qu'on peut les détruire par les rayons ultraviolets.

a) Irradiation précoce du croissant germinale en vue de l'étude de la dégénérescence des CGP

L'irradiation précoce du croissant germinale est parfaitement efficace puisque BENOIT (1930 a,b) a obtenu plusieurs cas de stérilité complète en opérant aux stades 4 et 5 HH (entre 18 et 22 heures d'incubation). Deux jours après l'irradiation, les sujets expérimentés ont montré des territoires gonadiques stériles - ou ne contenant qu'un ou deux gonocytes - alors que de nombreuses CGP, souvent altérées, n'ont pas pu quitter le croissant germinale ou sont demeurées dans les vaisseaux sanguins. Cependant, les blastodermes se montrant très sensibles aux traumatismes avant la fin du 1er jour d'incubation, conformément aux observations d'ANCEL (1956), l'irradiation précoce n'a pas été retenue comme pratique courante. Elle a été réservée pour l'étude de l'effet à court terme des rayons ultraviolets sur les CGP car, en opérant très tôt, il est possible de prélever le blastoderme quelques heures après l'irradiation pour isoler l'endoblaste du croissant germinale et examiner, après coloration, les gonocytes primordiaux.

En me référant aux travaux de BENOIT (1930 a) qui a utilisé des durées d'irradiation comprises entre 5 et 15 minutes, j'ai exposé aux ultraviolets les croissants germinaux de 10 blastodermes de stade 3⁺ HH (16 heures) pendant 10 minutes, en employant le filtre UG 5 transmettant des rayons de petite longueur d'onde. Les blastodermes traités ont été ensuite prélevés *in vitro* au terme de 3, 6 ou 15 heures d'incubation postopératoire. Ils avaient alors atteint respectivement

les stades 5 HH (prolongement céphalique), 7 HH (1 somite) et 9 HH (7 somites). Leur endoblaste a été isolé dans la région du croissant germinale, étalé sur une lamelle de verre et traité suivant la technique au PAS, afin d'être comparé aux témoins de même stade.

Dans 4 feuillets endoblastiques prélevés au stade 5 HH (3 heures après l'irradiation), de nombreuses CGP, reconnaissables grâce à leur grande taille (11 à 20 μ de diamètre) et à la présence de granules rouges PAS + dans leur cytoplasme, sont visibles dans la région du croissant germinale. Toutefois, certaines d'entre elles sont hypertrophiées et atteignent jusqu'à 25 μ de diamètre. Leur noyau est dilaté dans les mêmes proportions (14 μ au lieu de 9, en moyenne, chez les témoins) et la chromatine est peu visible sur les préparations contrastées à l'hématoxyline au dioxane (Pl. I,a).

Dans 4 autres croissants germinaux recueillis au stade 7 HH, 6 heures après l'irradiation, ces CGP anormales sont plus nombreuses que les normales. En outre, leur cytoplasme n'est presque plus coloré par le réactif de Schiff, ce qui les rend difficilement repérables (Pl. I,b). Leur contour est toujours rond ou elliptique et ne présente jamais les pseudopodes qui s'observent fréquemment, à ce stade, chez les CGP des témoins (Pl. I,c).

Enfin, 2 spécimens sacrifiés 15 heures après l'irradiation (stade 9 HH) contiennent encore, dans l'endoblaste de leur croissant germinale, de nombreuses CGP plus ou moins altérées, alors que chez les témoins elles ont déjà presque toutes émigré dans les lacunes mésoblastiques. Il apparaît donc que *l'irradiation du croissant germinale, dans les conditions où elle est pratiquée, entraîne en quelques heures la dégénérescence des CGP par hypertrophie suivie de cytolysse*. Par suite, leur incorporation au réseau vasculaire, due en partie à une migration active par pseudopodes (DUBOIS, 1969), ne peut sans doute pas s'effectuer normalement et seuls les mouvements d'infiltration du mésoblaste extra-embryonnaire sont susceptibles de détacher quelques CGP de l'endoblaste et de les entraîner dans les îlots sanguins en cours de formation. Quelques cellules endoblastiques somatiques paraissent subir la même dégénérescence que les CGP, mais elles n'ont pas fait l'objet d'une étude suivie.

b) Irradiation tardive du croissant germinal en vue d'une stérilisation compatible avec la survie embryonnaire

Afin d'obtenir une survie prolongée chez les embryons expérimentés, j'ai pratiqué l'irradiation du croissant germinal le plus tard possible, aux stades de 5 à 10 somites (8^+ à 10 HH) mais jamais au-delà puisque, d'après SIMON (1960 a), certaines CGP entament leur migration intravasculaire dès le stade suivant. Il est alors nécessaire d'irradier très largement et assez près de l'embryon car les CGP commencent à être dispersées par le mésoblaste extra-embryonnaire qui s'infiltre entre l'ectoblaste et l'endoblaste, ce qui entraîne un élargissement notable des pointes du croissant germinal (FARGEIX, 1966, REYNAUD, 1967).

J'ai commencé par irradier les croissants germinaux durant 4 à 11 minutes, en employant tantôt le filtre UG 5 transmettant une large bande d'ultraviolet, tantôt une combinaison de filtres (UG 11 + HG 312) ne donnant qu'une raie monochromatique à 3120 Å.

2) EFFETS TERATOGENES ET LETAUX DE L'IRRADIATION

Bien que l'opération intervienne à une période où les blastodermes résistent mieux aux traumatismes, *j'ai néanmoins obtenu de nombreuses malformations, létales à plus ou moins brève échéance.* A une exception près, tous les embryons irradiés sont morts avant l'éclosion.

Dans la première série expérimentale, 52 sujets sur 90 (58 %) sont morts avant le 4^e jour d'incubation. Certains présentaient un blastoderme desséché, sans doute à cause d'un prélèvement excessif d'albumen ou d'une irradiation trop étendue. D'autres avaient un amnios incomplètement ou anormalement développé, ce qui peut s'expliquer parce que son repli antérieur prend normalement naissance dans le territoire irradié. Chez d'autres encore, la lésion des flots sanguins de la région précéphalique soumise à l'irradiation entraînait tantôt le raccourcissement de la veine vitelline antérieure avec interruption du *sinus terminalis*, tantôt des malformations des capillaires afférents à ces vaisseaux (Pl. I, d, e, f, g).

Enfin, près de la moitié des embryons morts avant le 4^e jour d'incubation (25 sur 52) présentaient des anomalies affectant généralement l'encéphale (anencéphalie, exencéphalie, microcéphalie (*Pl. I, g*), microphtalmie) et connues pour être létales à brève échéance. Leur fréquence s'explique sans doute par le fait que la tête de l'embryon, qui avoisine le croissant germinatif, n'est pas toujours parfaitement protégée des rayons. Il faut souligner cependant que le taux de ces anomalies embryonnaires (25 sur 90, soit 28 %) n'est pas très supérieur à celui de 26 % relevé par ANCEL (1956) chez des oeufs qu'il a simplement ouverts à 28 heures d'incubation et dont il a prélevé une fraction de l'albumen. Les lésions des annexes embryonnaires (sac vitellin, amnios) par les rayons ultraviolets - généralement létales elles aussi - interviennent donc pour une bonne moitié dans le décompte des cas de mortalité précoce.

Parmi les 38 embryons qui ont franchi le 4^e jour, 24 sont morts avant la fin de la première semaine d'incubation, 8 avant la fin de la seconde et les 6 derniers - tous irradiés à l'aide des filtres UG 11 et Hg 312 - avant le 20^e jour. Ils ne présentaient aucune anomalie majeure et leur décès peut être dû soit à une action létale différée des rayons ultraviolets, telle que la lésion des cellules sanguines, soit à une faiblesse physiologique générale consécutive aux divers traumatismes subis par l'embryon.

Dans les autres séries expérimentales, tous les sujets irradiés qui ont dépassé le 3^e jour d'incubation sans présenter d'anomalie ont subi une injection intraveineuse de CGP de sorte qu'il est encore plus difficile de faire la part des effets létaux propres aux rayons ultraviolets.

3) RESULTATS - CONTROLE DE LA STERILITE

a) Témoins

Afin de disposer de témoins permettant d'apprécier l'efficacité de la stérilisation, 12 embryons de Poulet normaux ont été fixés, à raison de deux par jour, entre le 3^e et le 8^e jour d'incubation.

Chez les 6 premiers, récupérés avant le 6^e jour (stades 19, 22 et 26 HH), l'application de la technique au PAS révèle, conformément aux observations de MINTZ (1960), MEYER (1960, 1964) et CLAWSON et DOMM (1963), l'existence d'une réaction positive au niveau des gonocytes primaires contenus dans l'épithélium germinatif et dans le stroma des ébauches gonadiques (*Pl. II, a*). De plus, ces cellules ont des diamètres cytoplasmique et nucléaire très grands (voir plus bas), presque doubles de ceux des cellules somatiques environnantes. Leur noyau, disposé excentriquement, est généralement ovoïde et sa chromatine se présente souvent sous forme de deux amas irréguliers associés aux nucléoles. La centrosphère apparaît quelquefois sous l'aspect d'une tache claire jouxtant le noyau. Le glycogène cytoplasmique, mis en évidence par le PAS, est distribué sous forme de fines granulations colorées en rouge violacé. Des granules vitellins, généralement plus gros que les précédents, donnent aussi une réaction PAS + mais beaucoup moins intense et qui persiste à la suite du test de prédigestion du glycogène.

Chez les 2 embryons de 6 jours (stade 29 HH), la même technique a permis de retrouver de nombreux gonocytes primaires dans l'épithélium germinatif et dans les cordons sexuels de première poussée, en cours d'invagination dans le stroma gonadique (*Pl. II, b*). A partir de ce stade, il est possible de déterminer le sexe des embryons car l'asymétrie des gonades et de la répartition bilatérale des gonocytes est déjà plus prononcée chez les femelles.

Chez les 4 embryons sacrifiés au cours des 7^e et 8^e jours d'incubation, alors qu'on ne peut plus déceler la moindre trace de glycogène à l'intérieur des gonocytes, une technique de coloration classique permet encore de les identifier d'après leurs caractères morphologiques. En ce qui concerne la détermination du sexe, la situation est plus nette qu'au stade précédent. L'épithélium germinatif des gonades mâles s'est considérablement réduit et ne contient pratiquement plus de cellules germinales qui se trouvent pour la plupart dans les cordons médullaires (*Pl. II, c, d*). Au contraire, dans les gonades femelles, où se prépare la poussée des cordons corticaux, l'épithélium germinatif est très épaissi

et contient un très grand nombre de gonocytes, du moins dans la glande gauche qui s'est considérablement développée (Pl. II, e, f).

Les cellules germinales ont été dénombrées chez 11 témoins (Tableau 1). De plus, on a calculé la moyenne des deux valeurs obtenues pour chaque stade embryonnaire étudié, sauf pour le premier.

Tableau 1

Age (en jours d'incubation)	Stade (HH)	Sexe	Nombre de gonocytes primaires	Moyenne (N)
3	19	-	335	-
4	22	-	372 416	394
5	26	-	671 736	703
6	29	♂ ♂	1150 1292	1221
7	31	♀ ♀	2003 2255	2129
8	34	♂ ♀	4013 4498	4255

Nombre de gonocytes primaires chez des embryons de Poulet de 3 à 8 jours d'incubation

Ces résultats, qui concordent assez bien avec ceux de DEFRETIN (1924), VANNINI (1945) et VAN LIMBORGH (1968), font ressortir *une augmentation régulière de la population moyenne des gonocytes primaires au cours du développement embryonnaire.*

b) Sujets expérimentés

I°/ Dans la première série expérimentale comportant 90 sujets, 38 seulement ont atteint le stade 22 HH (4 jours) où il est possible de contrôler leur stérilité, toutes les CGP ayant d'ordinaire colonisé les crêtes génitales. 23 embryons, morts entre 4 et 19 jours d'incubation, possédaient des ébauches gonadiques bien pourvues en cellules germinales d'aspect normal : ils correspondaient tous à des sujets dont le croissant germinal avait été irradié soit au moyen d'une raie monochromatique (3120 Å), durant un délai quelconque, soit à l'aide d'une large bande d'ultraviolets (filtre UG 5) mais pendant de courtes durées seulement (4 à 6 minutes). Les préparations effectuées avec les 15 autres embryons, morts entre 4 et 12 jours, qui avaient été irradiés pendant plus de 6 minutes avec le filtre UG 5 ont révélé, au contraire, un manque total ou presque total de gonocytes dans les ébauches gonadiques (Tableau 2). Leurs populations (X) étant très faibles ou nulles par rapport à celles des témoins évaluées précédemment (N du Tableau 1), les index de stérilité $\left(\frac{N - X}{N}\right)$ correspondants étaient toujours supérieurs à 0,95 et, dans 7 cas sur 15, égaux à 1'unité, ce qui traduit une stérilisation parfaite.

Chez les 6 embryons fixés avant le 6^e jour d'incubation, les crêtes génitales sont développées mais moins saillantes dans le coelome que chez les témoins par suite de l'absence (ou de la rareté) des cellules germinales. Pour la même raison, la surface de l'épithélium germinatif est lisse et non festonnée (Pl. III, a, b). Chez les embryons recueillis à 6 jours, la première poussée de cordons sexuels - constitués exclusivement ou presque de cellules somatiques - est visible dans 2 cas sur 5. Cependant, le sexe ne peut pas être déterminé avec certitude à cause du manque de gonocytes.

Embryon n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Stade HH (nombre de somites) au moment de l'irradiation	8 ⁺ (5)	8 ⁺ (5)	8 ⁺ (5)	8 ⁺ (5)	8 ⁺ (5)	8 ⁺ (5)	9 ⁻ (6)	9 (7)	9 ⁺ (8)	9 ⁺ (8)	10 ⁻ (9)	10 ⁻ (9)	10 ⁻ (9)	10 ⁻ (9)	10 (10)
Durée de l'irradiation (en minutes)	7	9	10	10	10	10	7	10	10	11	7	10	10	11	10
Age au moment de la fixation (en jours d'incubation)	6	4	10	6	6	4	6	12	7	6	5	4	5	4	9
Nombre de gonocytes primaires dans les ébauches gonadiques (x)	17	24	28	4	11	0	21	0	0	0	0	0	2	11	0
	3	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Nombre de gonocytes "égarés"	0	0	0	0	0	1	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Index de stérilité $\left(\frac{N-X}{N}\right)$	0,98	0,93	0,98	0,99	0,98	1	0,97	1	1	1	1	1	0,990	0,97	1
Sexe de l'embryon			♀					♂	♀						♀

Tableau 2 - Résultats des expériences d'irradiation du croissant germinel

Dans le cas où quelques cellules germinales persistent, elles présentent assez souvent l'aspect anormal - hypertrophié et vide - décrit plus haut chez les CGP observées dans le croissant germinal quelques heures après son irradiation (*Pl. III, c*). De plus, chez deux sujets dont les gonades sont au stade indifférent (n°6 et 7), quelques CGP (13 en tout, dont 8 anormales) se voient dans la région dorsale de l'embryon à proximité du tube neural et de la corde (*Pl. III, d*). De tels gonocytes "égarés", dont la localisation est tout à fait étrangère au trajet de leur migration interstitielle finale, ont déjà été signalés chez des individus normaux ou expérimentés (BERENBERG-GOSSLER, 1914 ; SWIFT, 1914 ; DANTCHAKOFF, 1931 ; SIMON, 1960 a ; CLAWSON et DOMM, 1963 ; ASAYAMA, 1967). Lorsque ces gonocytes ont un aspect normal, il est probable qu'ils proviennent de CGP logées exceptionnellement en dehors du croissant germinal, à proximité de l'axe embryonnaire médio-dorsal (cf. FARGEIX, 1966 ; ROGULSKA, 1968 ; CLAWSON et DOMM, 1969). Ces cellules, soustraites à l'action des rayons ultraviolets dans le cas présent, peuvent s'incorporer directement à l'embryon mais, n'étant pas véhiculées par le sang, elles ne parviennent jamais jusqu'aux ébauches gonadiques (CLAWSON et DOMM, 1969) et ne jouent par conséquent aucun rôle dans l'élaboration des gamètes. Quand les gonocytes égarés sont anormaux, on doit invoquer plutôt leur incapacité d'accomplir une migration interstitielle orientée après leur sortie des vaisseaux sanguins ; ne pouvant plus répondre au stimulus attractif émanant des épithéliums germinatifs, ils se trouveraient refoulés en position dorsale par les mouvements d'extension et d'enroulement de la somatopleure. Ces deux explications s'accordent avec la thèse de SWIFT (1914), reprise par SIMON (1960 a), selon laquelle la rétention des gonocytes dans une région autre que le territoire gonadique n'est qu'un phénomène accidentel au cours de l'ontogénèse.

Chez les 4 embryons fixés après le 6^e jour d'incubation, la forme et la structure des gonades, ainsi que le développement des canaux de Müller permettent de reconnaître le sexe : 3 embryons sont du sexe femelle, 1 du sexe mâle. Chez une femelle de 7 jours d'incubation (n°9),

complètement stérile, seule l'asymétrie prononcée des ébauches gonadiques a permis de déterminer le sexe. Au contraire, chez les 2 autres sujets (n°15 et 3, âgés de 9 et 10 jours), la poussée de cordons corticaux dans la gonade gauche est suffisamment nette pour assurer l'appartenance au sexe femelle ; de plus, chez l'embryon de 10 jours (n°3), la portion la plus antérieure du canal de Müller droit a déjà disparu. Cet individu présente seulement 28 gonocytes primaires dans l'épithélium germinatif dilaté de sa gonade gauche. Etant donné que les embryons normaux possèdent à ce stade plus de 50 000 ovogonies (HUGHES, 1963), il est évident que les gonocytes observés ici, n'ayant pas pu restaurer une population germinale suffisante, sont voués à disparaître. L'embryon femelle de 9 jours (n°15) est quant à lui dépourvu de toute cellule germinale (*Pl. III, e, f*). Chez l'embryon mâle, mort à 12 jours d'incubation (n°8), les ébauches testiculaires sont parfaitement différenciées mais leurs cordons médullaires ne contiennent aucune cellule germinale (*Pl. IV, a, c*) alors qu'elles sont nombreuses chez les témoins (*Pl. IV, b, d*). Les deux canaux de Müller ont régressé normalement chez cet individu.

2°) Au cours de nombreuses séries expérimentales ultérieures, tous les embryons irradiés qui ont dépassé le 3^e jour d'incubation ont fait l'objet de transferts de CGP d'origine étrangère. Parmi eux, on a encore rencontré occasionnellement, lorsque le transfert a échoué, des spécimens totalement stériles (voir *Tableaux 5 et 6*) qui n'ont fait que confirmer les observations rapportées ci-dessus. Dans un cas cependant, un individu stérile a éclos, puis est parvenu à l'âge adulte.

c) Description d'un coq stérile

Ce sujet provient d'un oeuf de race Rhode Island (M₄₄) mis à incuber le 22/6/1972, irradié le lendemain (au stade 9⁺ HH, pendant 10 minutes), puis injecté à 4 jours à l'aide d'une suspension cellulaire provenant de la dissociation de croissants germinaux de race Wyandotte blanche (M₁₁). Eclos le 13/7/1972, il avait un aspect tout-à-fait conforme à celui des poussins de même race. Sa croissance s'est effectuée normalement et il a manifesté,

en temps normal, des caractères sexuels secondaires typiquement mâles (*Pl. IV,e*) : crête et ergots développés, plumage différencié (carnail, plumes en lancettes et en faucilles), chant et instinct batailleur. Il a commencé à cocher les femelles dès l'âge de 4 mois et demi. L'accouplement de ce coq avec 3 femelles différentes n'ayant produit aucun oeuf fécondé, on l'a suspecté de stérilité. Un prélèvement de sperme a donc été tenté grâce à la technique de massage décrite plus haut (cf. méthodes d'élevage). Après plusieurs essais infructueux, on a pu recueillir un peu de liquide blanchâtre contenant des débris cellulaires et quelques érythrocytes, mais entièrement dépourvu de spermatozoïdes (*Pl. IV,f*). On a donc bien affaire à un individu parfaitement stérilisé par les rayons ultraviolets et dont les ébauches gonadiques n'ont pas été peuplées par les gonocytes injectés.

4) DISCUSSION

a) De l'examen des embryons stériles qu'il a obtenus par irradiation de leur croissant germinal, BENOIT (1930 a) a conclu à une "destruction élective" des CGP de Poulet par les rayons ultraviolets. De fait, cette technique d'irradiation, appliquée ensuite aux germes d'Amphibiens (BOUNOURE, 1937, 1950 ; AUBRY, 1963 ; PADOA, 1963 ; SMITH, 1966), a permis de produire de nombreux individus stériles dont certains ont atteint l'âge adulte.

Chez le Poulet également, la dégénérescence des CGP contenues dans le croissant germinal, contrôlée par l'examen de plusieurs blastodermes irradiés, entraîne l'absence, souvent totale, de gonocytes primaires dans les ébauches gonadiques du sujet expérimenté. Cela confirme de nouveau l'interprétation de SWIFT (1914) et de tous ceux qui après lui ont soutenu la thèse, aujourd'hui universellement admise, de l'origine extra-gonadique des gonocytes primordiaux et de leur regroupement dans un territoire extra-embryonnaire précéphalique. De plus, le fait que des individus privés de CGP mais pourvus de glandes génitales saines et normalement différenciées demeurent stériles jusqu'à un stade avancé de leur

développement, voire jusqu'à l'âge adulte, démontre de façon péremptoire que les cellules somatiques de la gonade sont incapables de fournir des gonocytes. Cette constatation va à l'encontre de l'hypothèse de FIRKET (1914, 1920), reprise par CHISHIMA (1952), suivant laquelle les CGP dégénèreraient peu après leur arrivée dans les ébauches gonadiques et seraient remplacées par des cellules épithéliales banales. A moins de supposer, comme ASAYAMA (1967), que les cellules somatiques de l'épithélium germinatif doivent recevoir une influence inductrice de la part des CGP pour pouvoir se transformer en gonocytes, on doit admettre que *les CGP constituent chez les Oiseaux la seule source des cellules sexuelles.*

b) A la question de savoir s'il existe une période du développement où les CGP sont davantage sensibles aux ultraviolets, on peut répondre par la négative puisque *leur destruction s'obtient aussi bien au stade de la ligne primitive qu'à celui de 5 ou 10 somites* avec des durées d'irradiation du même ordre de grandeur. Les faibles fluctuations de l'index de stérilité (entre 0,93 et 1) constatées dans mes résultats doivent donc trouver leur explication dans le fait que quelques CGP ont pu échapper à l'irradiation ou dégénérer plus lentement que les autres.

c) On peut se demander s'il y a une relation entre la dose d'ultraviolets administrée, c'est-à-dire la durée de l'irradiation, et le degré de stérilité obtenue. Les résultats montrent qu'il n'existe pas de relation linéaire entre les deux, mais font apparaître *un seuil d'activité qui se place à 7 minutes d'exposition.* Des durées d'irradiation supérieures à 10 minutes accroissent considérablement le taux de mortalité sans améliorer le pourcentage des stérilisations.

d) On a constaté que *la stérilité complète n'empêche ni la croissance initiale, ni la différenciation des gonades.*

En fait, à 4 et 5 jours d'incubation, c'est-à-dire avant la première poussée de cordons sexuels, il est possible, conformément aux observations de MIMS et Mc KINNEL (1971), de noter une légère réduction de la taille des

ébauches gonadiques stériles par rapport aux témoins. En effet, les gonocytes primaires tiennent normalement à ce stade une assez grande place dans les crêtes génitales fertiles dont ils festonnent la surface et qu'ils font saillir dans le coelome. Par contre, dès le 6^e jour, alors que les gonocytes ont à peine doublé leur effectif en 24 heures, les cellules épithéliales commencent à proliférer intensément pour donner naissance aux cordons sexuels de première poussée. Le stroma gonadique est aussi le siège de nombreuses mitoses, de sorte que les cellules somatiques deviennent responsables au premier chef de la croissance des gonades. Ainsi, entre 6 et 12 jours d'incubation, on ne constate plus de réduction notable des ébauches gonadiques stériles.

L'absence d'éléments germinaux n'a empêché ni l'organogenèse des gonades, ni leur différenciation sexuelle ultérieure. Au stade indifférent, la première poussée de cordons sexuels se produit normalement pour donner naissance à des cordons séminifères typiques (mais stériles) chez les mâles. Chez les femelles, les cordons médullaires sont refoulés, en temps normal, vers le hile gonadique par une poussée de cordons corticaux tout aussi stériles. Comme chez les témoins, cette seconde prolifération de l'épithélium germinatif n'a lieu que du côté gauche, ce qui maintient une forte asymétrie des gonades, caractéristique du sexe femelle. Enfin, la production d'un coq stérile à caractères sexuels secondaires normaux montre que les cellules interstitielles du testicule se sont différenciées normalement en l'absence de toute cellule germinale. Ces observations infirment la thèse de DANTCHAKOFF (1932, 1933) selon laquelle la glande génitale aurait besoin de recevoir une influence inductrice de la part du germen pour se développer et se différencier. Elles corroborent au contraire les conclusions de SIMON (1960 b) qui a obtenu des ébauches testiculaires ou ovariennes en cultivant *in vitro* des crêtes génitales stérilisées par ablation du croissant germinal, et celles de DUBOIS (1962) qui a observé les mêmes résultats après irradiation *in vivo* de cette ébauche aux rayons X.

e) *L'irradiation aux ultraviolets du croissant germinale n'est pas exempte d'effets nocifs sur le soma de l'embryon de Poulet.* Chez certains sujets expérimentés par BENOIT (1930 a), le mésoderme ne s'est pas segmenté en somites et DANTCHAKOFF (1934) a prétendu que la stérilité des gonades pouvait être liée au développement incomplet ou anormal de leur ébauche somatique. Les sujets que j'ai traités n'ont jamais présenté une telle anomalie, mais j'ai constaté d'autres malformations qui confirment notamment la sensibilité particulière aux ultraviolets des systèmes nerveux et sanguin, déjà signalée par HINRICHS (1931). Les anomalies qui affectent l'embryon - presque toujours localisées à l'encéphale - sont constamment létales à brève échéance, de même que celles qui entravent le développement de l'amnios. Les lésions de l'aire vasculaire précéphalique peuvent avoir également des effets nocifs. En premier lieu, il est fort possible que la sensibilité des hémato-blastes aux rayons ultraviolets soit responsable au premier titre de la mort des embryons normalement constitués. En second lieu, la sensibilité des ang*i*oblastes, qui se traduit par des malformations des vaisseaux vitellins précéphaliques, peut aussi être létale. Ces malformations peuvent contribuer à parfaire la stérilisation des embryons en empêchant le passage de quelques CGP dans le courant sanguin. Néanmoins, il est exclu qu'elles soient responsables de la stérilité complète qui a été généralement constatée chez des embryons à circulation vitelline normale.

B - TRANSFERT DES CGP DU DONNEUR A L'HOTE STERILE

1) METHODE EXPERIMENTALE

a) Préparation de la suspension de CGP destinée à être injectée

Les CGP destinées à être injectées doivent être prélevées dans l'endoblaste du croissant germinale au stade où elles sont les plus nombreuses. Or,

dès le stade du repli céphalique (6 HH), plusieurs CGP commencent à se détacher du feuillet profond du blastoderme pour passer dans les lacunes mésoblastiques. On risquerait donc, en opérant plus tard, de perdre un grand nombre de gonocytes primordiaux. D'un autre côté, il faut éviter de prélever l'endoblaste au stade précoce de la ligne primitive (4 HH) parce qu'il ne possède pas encore son nombre définitif de CGP (SWIFT, 1914 ; CLAWSON et DOMM, 1969). J'ai donc choisi de recueillir ces cellules au stade intermédiaire du prolongement céphalique (5 HH), atteint à 20 heures d'incubation chez le Poulet et à 24 heures chez le Dindon (REYNAUD, 1972).

Pour recueillir *in vitro* les CGP et les mettre en suspension dans un liquide, il faut d'abord séparer les deux feuillets germinaux extra-embryonnaires qui composent le croissant germinale et soumettre ensuite l'endoblaste à un traitement destiné à le désagréger. Ces deux opérations n'ont posé aucun problème car les techniques qu'elles impliquent étaient déjà connues (cf. techniques opératoires, § 2b). Dans le cas d'un matériel jeune et à structure lâche comme le feuillet endoblastique, la dilacération, suivie de la dissociation mécanique des cellules dans un milieu dépourvu d'ions Ca^{++} et Mg^{++} , s'est avérée pleinement satisfaisante. Quelques essais de trypsination selon la technique de MOSCONA (1952) n'ont pas permis d'obtenir une désagrégation plus rapide ou plus poussée du croissant germinale.

b) Dénombrement des CGP dans les suspensions cellulaires

L'examen microscopique d'échantillons frais provenant des suspensions cellulaires les plus homogènes permet de déceler de nombreuses cellules intactes et bien isolées, ainsi que quelques petits agrégats de cellules. On observe également de nombreux globules vitellins très réfringents dont les uns sont assez volumineux (5 à 15μ de diamètre) et les autres, plus abondants, de taille inférieure (1 à 5μ).

L'examen des échantillons fixés au Gendre et traités au PAS confirme la présence de cellules isolées et généralement intactes parmi

lesquelles les cellules endoblastiques banales sont les plus nombreuses. Les CGP, beaucoup plus rares, se reconnaissent à leur grande taille et à la réaction PAS + de leur cytoplasme. Elles ne sont jamais incorporées aux petits agrégats de cellules somatiques, ce qui tient peut être au fait qu'elles ne font que transiter par l'endoblaste (DUBOIS, 1967, 1968b, 1969) et que certaines en étaient déjà partiellement dégagées au moment du prélèvement. Les granules vitellins se retrouvent également, teintés en rouge par le réactif de Schiff (*Pl. V, a, b*).

Lors des premières séries expérimentales, on n'a procédé qu'à une estimation sommaire du nombre de CGP dans les suspensions cellulaires. On s'est basé, en effet, sur les comptages de SIMON (1960 a) faisant état, chez le Poulet, d'une population de 75 à 125 CGP par croissant germinal. Des effectifs de même ordre de grandeur (100) ont été retrouvés ensuite chez le Dindon. Le volume final de la goutte de Locke contenant les cellules en suspension étant de 5 mm³ et la dose injectable (d.i.) de 0,5 mm³, on aurait abouti, en dissociant un seul croissant germinal, à une densité de ± 10 CGP/d.i., dans le cas d'une dispersion cellulaire parfaite. Cette densité étant apparue trop faible dès l'abord, on l'a augmentée en désagrégeant 5 croissants germinaux dans la même quantité de Locke, pour disposer en moyenne de 50 CGP/d.i. Dans une série expérimentale plus récente, où la dissociation des croissants germinaux de Dindon se faisait dans les mêmes conditions, on a procédé au dénombrement précis des CGP dans 2 suspensions cellulaires. 3 prélèvements de 0,5 mm³ ont été faits dans chacune d'elles et ont été traités au PAS afin de repérer facilement les gonocytes primordiaux pour les dénombrer (*Tableau 3*). La densité moyenne est égale à 57 CGP/d.i., soit 114 CGP par mm³ et par croissant germinal, ce qui est assez proche de la valeur trouvée par simple estimation. Des comptages similaires ont été faits ensuite chez le Poulet et ont fourni une moyenne de 72 CGP/d.i., ce qui correspond à 144 CGP par mm³ et par croissant germinal (*Tableau 3*). Ce nombre est inférieur à celui trouvé par CLAWSON et DOMM (1969) qui est de 192 CGP en moyenne par croissant germinal, au stade du prolongement céphalique. Cette différence s'explique par le fait que ces auteurs ont utilisé des coupes histologiques permettant de dénombrer

également les CGP déjà détachées de l'endoblaste ("dPGC") et qui sont perdues lors de son isolement.

Je n'ai pas fait le comptage précis des cellules somatiques de l'endoblaste du croissant germinale. Cependant, l'examen microscopique des échantillons de suspensions cellulaires a montré que les cellules somatiques étaient environ 100 fois plus nombreuses que les CGP, ce qui permet d'estimer leur population à 5 000/d.i. Les corpuscules vitellins n'ont fait l'objet, quant à eux, d'aucun comptage.

Suspension cellulaire	Echantillon (0,5 mm ³)	Dindon		Poulet	
		Nbre de CGP	Moyenne	Nbre de CGP	Moyenne
A	1	45	57	88	72
	2	56		80	
	3	79		44	
B	1	48	57	76	72
	2	87		51	
	3	28		92	

Tableau 3 - Nombres de CGP présentes dans les suspensions cellulaires provenant de la dissociation de croissants germinaux de Dindon et de Poulet.

c) Injection à l'hôte des CGP du donneur

L'injection de liquide dans le réseau vasculaire vitellin est théoriquement possible dès l'établissement de la circulation sanguine extra-embryonnaire (stade 12 HH atteint vers 45 heures d'incubation). Toutefois, il est préférable d'injecter les vaisseaux vitellins lorsqu'ils sont plus gros et que leur paroi est plus résistante, c'est-à-dire à partir de 3 jours d'incubation (stade 19 HH). D'un autre côté, l'opération ne peut se faire facilement et sans danger pour l'embryon que jusqu'à 5 jours d'incubation (cf. Chapitre II, A). La technique d'injection dans la circulation sanguine vitelline est connue depuis WEISS et ANDRES (1952) qui ont introduit ainsi des suspensions cellulaires provenant d'embryons de Poulet broyés chez d'autres embryons de 3 ou 4 jours d'incubation (voir : techniques opératoires, 2,c et d). Ce procédé a permis aux deux auteurs de montrer que certaines cellules injectées - les mélanoblastes - avaient la faculté de retrouver les territoires qu'elles colonisent normalement (phénomène de "homing"). Afin de suivre le développement de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial, la technique a été reprise par KENT (1961) pour l'injection de particules de carbone, et par MARTINOVITCH *et al.* (1961, 1962) pour le transfert d'ADN provenant de testicules de coqs Rhode Island à des embryons de race Leghorn.

Au cours des premières séries expérimentales, les embryons de Poulet dont le croissant germinifère a été irradié à 28 heures et qui ont développé un réseau vasculaire fonctionnel, ont été injectés 2 jours plus tard, soit vers 76 heures d'incubation totale (stade 20 HH).

Par la suite, après des essais d'injection à 4, 5 et 6 jours d'incubation (cf. Chapitre II, A), on a choisi d'opérer régulièrement à 4 jours (stade 22 HH) parce que l'embryon est plus résistant qu'à 76 heures. Chaque embryon a reçu dans une de ses veinules vitellines, $0,5 \text{ mm}^3$ de la suspension cellulaire obtenue par dissociation de 5 croissants germinaux de Poulet ou de Dindon dans 5 mm^3 de Locke sans calcium.

d) Effets létaux de l'injection

Dans les premières séries expérimentales, sur 102 sujets injectés à 76 heures, 39 (soit 38 %) sont morts dans les 48 heures suivant l'opération. Bien qu'il faille tenir compte de certains effets différés de l'irradiation tels que la lésion des hémotoblastes, il ne fait aucun doute que la plupart des décès soient dûs aux troubles consécutifs à l'injection, déjà décrits par WEISS et ANDRES (1952) : hémorragie, épanchement de sang dans le coelome extra-embryonnaire, congestion du coeur et des gros vaisseaux, embolie. De plus, l'étude de la distribution relative de la mortalité embryonnaire montre que l'injection intervient à une phase très critique du développement puisque plus de 25 % de tous les cas de mortalité se produisent entre le 3^e et le 5^e jour d'incubation chez des oeufs intacts (*Fig. 4*).

16 % des embryons injectés sont morts plus tard, entre le 7^e et le 8^e jour d'incubation. Ce second pic de mortalité coïncide assez bien avec la mise en place définitive de la membrane chorio-allantoïdienne qui vient s'appliquer contre la face interne des membranes coquillières. Chez les oeufs qui ont été ouverts et qui ne peuvent pas être retournés complètement (voir : conduite de l'incubation), des adhérences se forment sans doute fréquemment entre ces deux catégories de membranes et peuvent entraîner la mort de l'embryon par stase sanguine. Chez les oeufs intacts qui sont régulièrement retournés, la mortalité embryonnaire n'est que de 4 % durant la même période. Un 3^e pic de mortalité se situe entre les 11^e et 12^e jour d'incubation. Il est moins élevé que les précédents (13 % de décès) et n'a pas d'homologue chez les sujets intacts. Il intervient juste après le début de la période d'absorption de l'albume par l'embryon (cf. ROMANOFF, 1960) et il pourrait être lié à la présence de Locke capable d'en altérer les qualités. Enfin, tous les embryons expérimentés qui ont franchi ces 3 phases critiques (22 % seulement) sont morts en cours d'éclosion ou pendant les 3 jours précédents. Cela n'est pas étonnant si l'on considère que chez les oeufs intacts cette période finale de l'incubation (entre 18 et 21

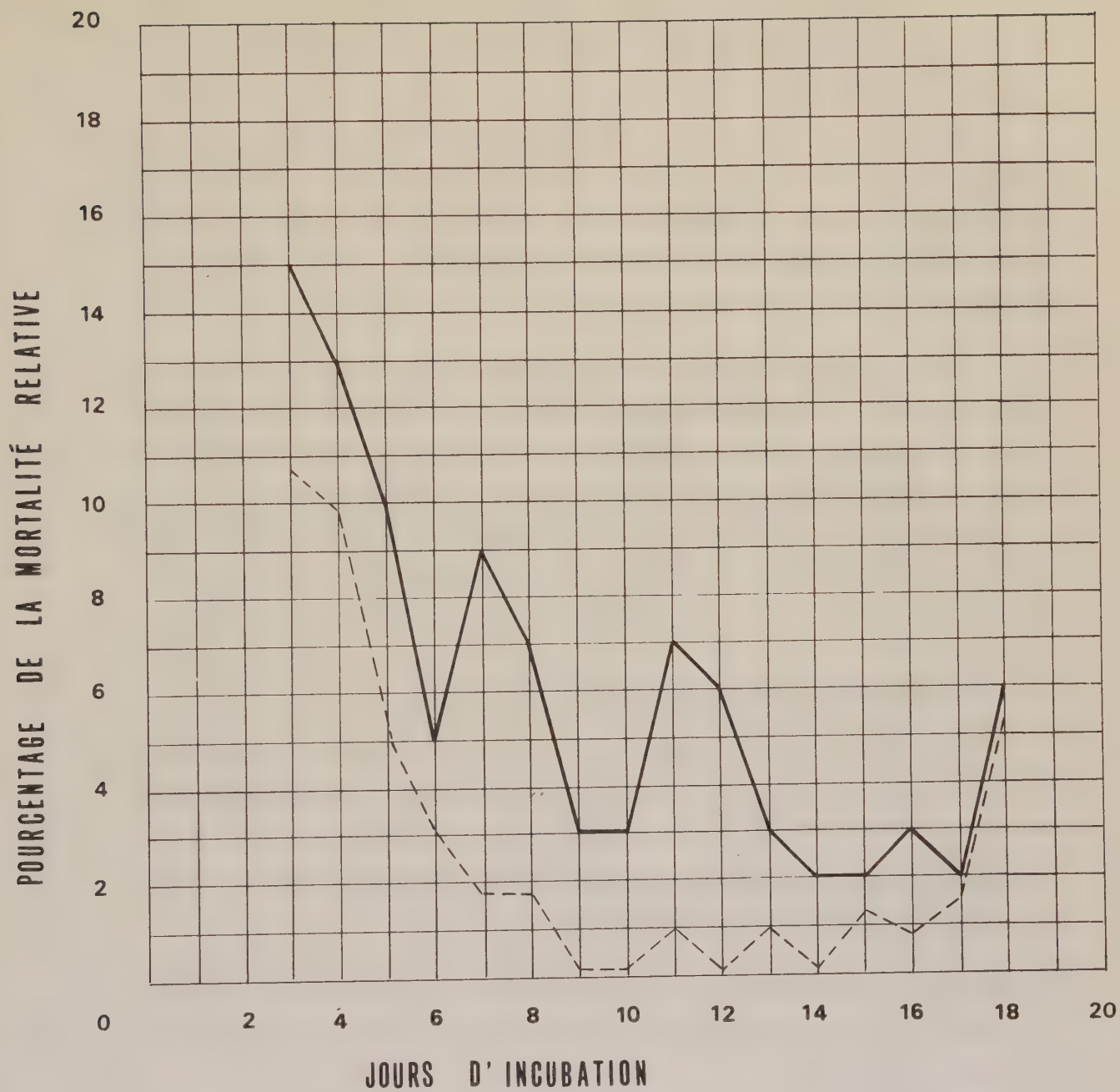


Fig.4 - Distribution relative de la mortalité embryonnaire entre 3 et 18 jours d'incubation chez des oeufs expérimentés (-) et intacts[---](La courbe concernant les sujets intacts est tirée de BRONKHORST, 1933).

jours) est responsable de la mort de 18 % des embryons, c'est-à-dire de la moitié environ de la mortalité embryonnaire totale pour une race à taux d'éclosion moyen (64 %).

Dans les dernières séries expérimentales (depuis 1970), en injectant les embryons à 4 jours et en humidifiant les oeufs en fin d'incubation (voir : soins postopératoires), on a pu faire éclore 8 poussins sur un effectif global de 130 sujets expérimentés, ce qui représente un taux d'éclosion de 6 % seulement.

Ce qui vient d'être dit paraît montrer que *l'injection est uniquement responsable des décès survenant dans les 48 heures qui la suivent* (38 % au maximum). Tous les autres cas de mortalité embryonnaire ultérieure seraient plutôt dûs à l'ouverture de l'oeuf, à l'ajout de Locke à l'albumen et à une faiblesse physiologique de l'embryon en fin d'incubation, consécutive à l'ensemble des traumatismes qui lui ont été infligés.

e) Identification des cellules germinales

Afin de pouvoir distinguer les cellules germinales de Poulet et de Dindon, au cours des transferts interspécifiques, on a mesuré chez les deux espèces les diamètres cytoplasmique et nucléaire :

1°/ des CGP dans le croissant germinale étalé sur lamelle et traité selon la technique au PAS (Pl. V, c, d)

2°/ des gonocytes primaires dans les ébauches gonadiques sectionnées après coloration en masse de l'embryon par la même technique (Pl. V, e, f)

Les différentes mesures, leur moyenne, leur dominante et les rapports nucléoplasmiques correspondants ont été regroupés dans le Tableau 4.

On constate que les diamètres cytoplasmiques des CGP sont constamment supérieurs à ceux des gonocytes primaires de la même espèce. On pourrait supposer que cette variation de la taille des gonocytes

Espèce	C G P				Gonocytes primaires			
	Limites	Domini- nante	Moyenne	N/P	N/P	Moyenne	Domini- nante	Limites
Poulet	N (μ) 7 - 11	9	9,18	0,60	0,72*	8,53	8,5	6,4 - 10,6
	P (μ) 11 - 20	15	15,3			11,18	11,25	9 - 15
Dindon	N (μ) 8 - 15	10 12,5	10,5	0,47	0,55	9,5	9	7,5 - 12,5
	P (μ) 17 - 31	22,5 25	22,75			17,75	17,5	15 - 23

Tableau 4 - Diamètres nucléaires (N), cytoplasmiques (P) et rapports nucléoplasmiques (N/P) des gonocytes de Poulet et de Dindon mesurés dans le croissant germinel et dans les ébauches gonadiques.
(* valeur tirée de SIMON, 1960 a)

n'est qu'apparente et résulte de la différence des traitements histologiques subis respectivement par les tissus qui les contiennent : feuillet étalé dans un cas, coupe au microtome dans l'autre. Cependant, CLAWSON et DOMM (1969) ont eux aussi noté, sur des préparations uniformes (coupes histologiques) une diminution importante (de l'ordre de 20 %) du diamètre des CGP de Poulet entre le moment où elles adhèrent à l'endoblaste et celui où elles sont détachées. Ils attribuent ce phénomène à la digestion des granules vitellins intracytoplasmiques (voir aussi HARDISTY, 1967). Les noyaux des gonocytes primaires présentent, par rapport à ceux des CGP, une diminution de taille beaucoup plus faible (8 % environ) et qui peut être, quant à elle, entièrement due aux divers traitements histologiques. Cette différence de comportement entre noyaux et cytoplasmes rend compte de la modification du rapport nucléoplasmique, constatée chez les deux espèces, entre les CGP et les gonocytes primaires. *Pour les CGP, le rapport nucléoplasmique est de 0,47 chez le Dindon contre 0,60 chez le Poulet, tandis que pour les gonocytes primaires, il est de 0,55 contre 0,72.* Dans les deux cas, ces valeurs sont suffisamment différentes d'une espèce à l'autre pour permettre de déterminer avec certitude la provenance des gonocytes que l'on pourra trouver dans les ébauches gonadiques des sujets injectés.

2) RESULTATS. PEUPLEMENT DES GONADES STERILES PAR LES CGP INJECTEES

a) Colonisation des ébauches gonadiques de Poulet par des gonocytes de Dindon

I°/ Dans la première série expérimentale, 102 embryons stérilisés de race Rhode Island (M_{44}) ou Wyandotte (M_{11}) ont été injectés à 76 heures d'incubation. 15 sujets sont morts aussitôt après l'opération ou dans les quelques heures suivantes et n'ont pas été conservés. 28 embryons sont décédés entre 4 et 6 jours d'incubation et ont été fixés au Gendre en vue de leur coloration *in toto* par la technique au PAS (lot n°1). 22 autres individus, morts entre 7 et 10 jours, ont été fixés au Bouin et les coupes

de leur région gonadique ont été colorées selon une technique courante (lot n°2). Enfin, les 37 embryons restants sont décédés entre le 11^e et le 21^e jour d'incubation et seules leurs gonades ont été fixées au Bouin et colorées après section (lot n°3).

Des comptages exhaustifs de gonocytes primaires ont été faits chez 10 embryons du lot n°1 et chez 4 embryons du lot n°2. Ils ont été utilisés pour établir les index de repeuplement germinale de ces 14 sujets par rapport aux embryons témoins de Poulet ($\frac{Y}{N}$) et de Dindon ($\frac{Y}{N}$). De plus, on a mesuré chez chacun d'eux une quinzaine de gonocytes primaires afin de calculer leur rapport nucléoplasmique. Dans le lot n°3 on n'a procédé à aucune mesure et à aucun comptage exhaustif mais, chez 6 embryons, on a tenté d'estimer la densité des populations de cellules germinales. Tous les résultats des mesures et des comptages cellulaires sont réunis dans le *Tableau 5*.

A l'exception d'un seul individu (embryon n°7) ne possédant que 4 gonocytes primaires, *tous les sujets injectés examinés présentent des nombres de cellules germinales très supérieurs à ceux qui n'ont subi que l'irradiation (cf. Tableau 2)*. A 4 jours d'incubation, 24 heures après l'injection (embryons n°1 à 3), la population des gonocytes primaires est comprise entre 50 et 90, ce qui correspond bien au nombre moyen de CGP (57) contenues dans une fraction injectable de suspension cellulaire. Entre 5 et 11 jours (embryons n°4 à 15), le nombre de gonocytes est en augmentation constante et rapide si bien qu'il dépasse 3.000 à la veille de la formation des gonies, qui débute normalement dès la fin du 8^e jour d'incubation chez les femelles (SWIFT, 1915) et vers le 13^e jour chez les mâles (SWIFT, 1916). Durant cette même période, la progression régulière des index de repeuplement germinale - et notamment de $\frac{Y}{N}$, qui atteint presque l'unité - montre l'intervention d'un *phénomène de régulation de population* qui sera étudié plus loin (chapitre II, B). Enfin, au-delà du 15^e jour d'incubation (embryons n°16 à 20), les nombres de gonies rencontrées s'élèvent à plusieurs dizaines de milliers.

Les gonocytes primaires présents dans les crêtes génitales des sujets injectés sont constamment bien repérables avant le 7^e jour d'incubation grâce

à la technique au PAS (*Pl. VI : a, b*). A l'exception du cas déjà cité (n°7), leur rapport nucléoplasmique est toujours très voisin sinon identique à celui du Dindon (0,55). On peut donc affirmer que chez les 11 embryons de Poulet où ce rapport a été calculé, les ébauches gonadiques ont été effectivement colonisées par les CGP de Dindon transférées. Quant au spécimen n°7 qui, 3 jours après l'injection, ne présente que 4 gonocytes (2 normaux, 2 anormaux) dont le rapport nucléoplasmique est très proche de celui du Poulet (0,72), c'est sans aucun doute un embryon convenablement stérilisé mais dont les crêtes génitales n'ont fixé aucune cellule germinale de Dindon.

La transformation des gonocytes primaires en gonies, après une période de prolifération intense, s'effectue normalement et fait suite à une différenciation sexuelle qui n'est jamais ambiguë. Ainsi, parmi les 13 embryons morts à partir du 6^e jour d'incubation (n°8 à 20), on a pu reconnaître aisément 6 mâles (*Pl. VI : c, d, e, f*) et 7 femelles (*Pl. VII : a, b, c, d*) chez lesquels le développement bilatéral des gonades et des gonoductes est absolument conforme au sexe révélé par la structure histologique des glandes génitales. Chez les mâles expérimentés, comme chez les témoins, les spermatogonies, tout en se divisant activement, se maintiennent sans changement jusqu'à l'époque de l'éclosion (*Pl. VI : d, f*). Chez les deux embryons femelles parvenus en fin d'incubation (n°17 et 18), des ovogonies sont toujours présentes mais de nombreux ovocytes primaires sont apparus (*Pl. VII, d*). Leur aspect est tout-à-fait normal et leur diamètre, conforme à celui des ovocytes de dinde (25 μ en moyenne), est sensiblement supérieur à celui des ovocytes de poule (20 μ en moyenne). Cette observation confirme de nouveau la colonisation des gonades des embryons-hôtes par les cellules germinales des donneurs. De plus, elle montre que ces cellules, bien que logées dans un soma gonadique étranger, peuvent subsister sans dommage apparent et préparer leur maturation.

2°/ Dans une seconde série expérimentale où l'on a injecté à 4 jours d'incubation 35 embryons de Poulet hybrides ($M_{44} \sigma \times M_{11} \varphi$) préalablement stérilisés, 32 sujets morts ont été fixés à des stades divers entre le 5^e et le 21^e jour. L'examen histologique de leurs glandes génitales a permis de

Embryon n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Age au moment de la fixation (en jours d'incubation)	4	4	4	5	5	5	6	6	6	6	7	7	8	8	11	16	19	20	21	21
Stade HH	22	22	22	26	26	26	29	29	29	29	31	31	34	34	37	41	43	44	45	45
Nombre [de gonocytes primaires (Y) de gonies]	87	62	59	152	167	125	4	504	532	650	1508	1489	3069	3307						
	Plusieurs milliers																			
Index de repeuplement germinal [/ Poulet (Y/N) / Dindon (Y/N')]	0,22	0,15	0,15	0,22	0,24	0,18	0	0,41	0,44	0,54	0,71	0,70	0,72	0,77						
	0,45	0,32	0,30	0,43	0,47	0,35	0	0,61	0,64	0,78	0,94	0,92	0,87	0,94						
Rapport N/P des gonocytes primaires	0,54	0,55	0,55	0,54	0,55	0,55	0,68	0,55	0,56	0,54	0,56	0,55	0,55	0,56						
Sexe								♀	♂	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂

Tableau 5 - Résultats des expériences d'injection de CGP de Dindon à des embryons de Poulet stérilisés

confirmer en tous points les résultats de la série précédente. Les 3 autres sujets ont pu franchir le stade de l'éclosion et ont fait l'objet d'une étude particulière (cf. Chapitre III, p.77)

b) Transfert de gonocytes primordiaux entre Poulets de races différentes

Afin de réaliser des transferts intraspécifiques de gonocytes, les embryons des deux souches de Poulet (M_{11} et M_{44}) ont été utilisés tantôt comme hôtes, tantôt comme donneurs. Il faut remarquer que dans le cas de tels transferts, il est encore possible de contrôler par des examens histologiques le peuplement germinal des ébauches gonadiques de l'embryon après irradiation du croissant germinal et injection de CGP. Cependant, les gonocytes primaires de ces deux races de Poulet ayant le même rapport nucléoplasmique, il est impossible d'attribuer les cellules germinales rencontrées dans les ébauches gonadiques à une race plutôt qu'à l'autre, c'est-à-dire au donneur plutôt qu'à l'hôte. Par suite, seuls les résultats des accouplements effectués entre des sujets expérimentés parvenus à maturité sexuelle pourront permettre d'affirmer la réussite des transferts de gonocytes (cf. Chapitre IV, p.103).

3) DISCUSSION

a) On peut s'interroger sur le comportement des CGP que l'on a introduites dans le sang 10 à 15 heures plus tôt qu'elles n'y pénètrent habituellement. 24 heures après l'injection, on retrouve les gonocytes primordiaux du donneur dans les ébauches gonadiques de l'hôte : *ils sont donc déjà capables de répondre au stimulus attractif émanant des épithéliums germinatifs*, ce qui confirme les observations faites *in vitro* par DUBOIS (1964) et *in vivo* par ROGULSKA (1969). De plus, les populations de gonocytes trouvés à ce moment-là (50 à 80) sont très voisines des nombres de CGP contenues dans les suspensions cellulaires injectées. Compte tenu du fait que les CGP ne se multiplient pas pendant leur migration

intravasculaire (SWIFT, 1914 ; DANTCHAKOFF, 1932 ; BLOCKER, 1933 ; SIMON, 1960 a), on peut en conclure qu'elles sont toutes parvenues à destination et qu'elles n'ont séjourné par conséquent que 24 heures dans le sang, c'est-à-dire ni plus ni moins qu'à l'accoutumée (SINGH et MEYER, 1967). Enfin, le fait que les éléments germinaux rencontrés dans les gonades aient un rapport nucléoplasmique plus proche de celui des gonocytes primaires de Dindon que des CGP montre que la digestion des réserves vitellines a pu s'accomplir durant la migration intravasculaire de manière également normale.

b) Les suspensions cellulaires étant préparées par dissociation de 5 croissants germinaux de Dindon ou de Poulet, il est évident que dans la plupart des cas des gonocytes génétiquement mâles et femelles (de constitution chromosomique ZZ et ZW) s'y trouvent mêlés. Par suite, un certain nombre d'entre eux seulement seront de sexe conforme à celui de l'hôte. Le fait que les cellules germinales observées chez les sujets injectés aient toujours été d'aspect normal et conforme au sexe de la gonade semble confirmer que *leur différenciation, indépendante de leur constitution génétique, est imposée par les tissus somatiques qui les hébergent* (voir également : Chapitre III, Discussion : a).

c) Etant donné que les suspensions cellulaires injectées contiennent, à côté des CGP, de nombreuses cellules endoblastiques somatiques, on peut soulever le problème de leur destinée et des accidents qu'elles pourraient provoquer chez les hôtes. Ces cellules, au cours des premières heures qui suivent l'injection, doivent rester isolées ou former de petits agrégats dans les vaisseaux embryonnaires et vitellins. Selon WEISS et ANDRES (1952), quelques agrégats peuvent pénétrer dans les tissus en provoquant une petite embolie suivie de la rupture d'un capillaire, mais ils ne subsistent que s'ils atteignent un milieu approprié ("type specific localization") qui leur permet de se fixer, de proliférer et de se différencier ; dans le cas contraire, ils sont résorbés plus ou moins vite. La possibilité de retrouver un milieu préférentiel ("preferential cell lodging" ou "homing") n'est aujourd'hui reconnue qu'à certains types cellulaires tels que les mélanoblas-

tes, les petits lymphocytes et les CGP (BURDICK, 1968). Toutes les autres cellules embryonnaires (coeur, membres, oeil notamment) qui ont été introduites dans le sang d'un embryon de Poulet de 7 jours se localisent ensuite essentiellement dans son foie et dans ses reins, comme le font d'ailleurs des particules inorganiques (HOLLYFIELD et ADLER, 1970). Les éléments transférés sont disséminés à l'intérieur de ces deux organes, ce qui explique qu'ils passent ensuite complètement inaperçus, à moins d'avoir été marqués à l'aide d'un isotope radioactif. Des tumeurs consécutives à l'injection intravasculaire de cellules ont été trouvées parfois dans le sac vitellin et dans la chorio-allantoïde par ANDRES (1953). Je n'en ai personnellement observé aucune mais il faut dire que je ne les ai pas recherchées systématiquement.

Dans le cas des transferts interspécifiques, il est exclu que l'on assiste à l'agglutination des cellules du donneur (parmi lesquelles quelques hémotoblastes peuvent se trouver) par le plasma sanguin de l'hôte, étant donné que RYLE (1957) a montré que les agglutinines de Poulet susceptibles de réagir avec les antigènes de Dindon n'apparaissent chez l'embryon qu'à partir du 13^e jour d'incubation.

RESUME

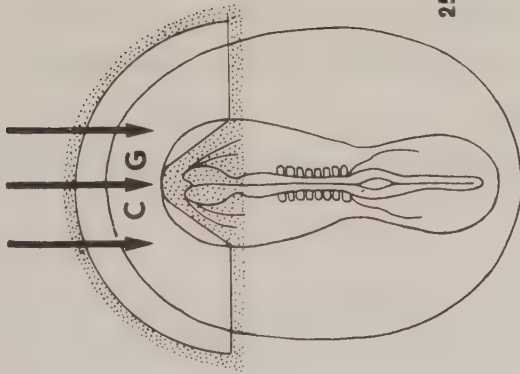
Une technique de substitution des gonocytes primordiaux a été mise au point chez l'embryon de Poulet. La destruction des CGP de l'hôte est obtenue par l'irradiation aux rayons ultraviolets de son croissant germinale. Le transfert de gonocytes est réalisé ensuite par l'injection, dans son réseau vasculaire vitellin, d'une suspension cellulaire provenant de la dissociation de croissants germinaux d'une autre espèce ou d'une autre race (*Fig. 5*).

Fig. 5 - Schéma des opérations de transfert des gonocytes primordiaux

(CG : croissant germinale ; CGP : cellules germinales primordiales ;
UV : rayons ultraviolets).

HÔTE (POULET)

U.V.



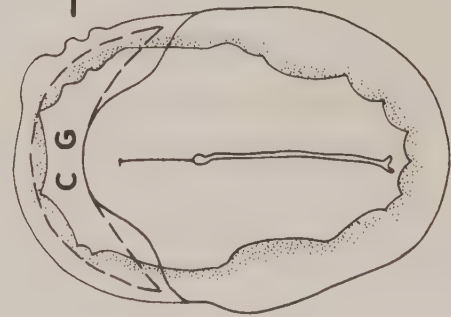
25-30 h (stade 8-10 H.H.)

A



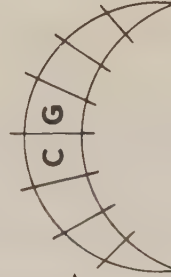
3-5 j (stade 20-26 H.H.)

C



24 h (stade 5 H.H.)

B



solution
acalcique

CGP

DONNEUR (DINDON)

I. Chez l'embryon de Poulet aux stades 8⁺ à 10 HH (5 à 10 somites), l'irradiation aux rayons ultraviolets d'un territoire extra-embryonnaire incluant largement le croissant germinale permet la destruction totale ou quasi totale des CGP. La stérilité totale n'empêche ni l'organogenèse des gonades ni leur différenciation sexuelle. L'irradiation n'est pas inoffensive pour le soma puisque 40 % seulement des embryons traités survivent jusqu'au stade 19 HH (3 jours) où ils pourront être injectés.

2. Au stade 5 HH (prolongement céphalique), la dissociation mécanique des croissants germinaux de Dindon ou de Poulet dans du Locke sans calcium fournit des suspensions cellulaires homogènes contenant des CGP toujours bien isolées.

3. Chez les embryons de Poulet stérilisés par irradiation qui ont pu atteindre le stade 19 HH, l'injection dans une veinule vitelline d'une fraction de la suspension cellulaire contenant des CGP n'entraîne, en dehors de quelques accidents circulatoires immédiats, aucune réaction spécifique. Elle contribue cependant à diminuer la résistance des sujets expérimentés puisque 6 % d'entre eux seulement sont capables d'éclore.

4. La combinaison des trois opérations ci-dessus permet d'obtenir des ébauches gonadiques de Poulet exclusivement peuplées par des gonocytes primordiaux de Dindon qui prolifèrent et se différencient normalement dans les deux sexes.

CHAPITRE II

FIXATION ET PROLIFERATION DES CGP TRANSFEREES

Les expériences préliminaires décrites dans le chapitre précédent montrent que les ébauches gonadiques stériles de Poulet sont capables de fixer les CGP un peu plus tard qu'elles ne le font habituellement. Il paraissait donc intéressant d'utiliser cette technique d'injection pour déterminer jusqu'à quelle période du développement persiste la compétence des gonades. En effet, sur le plan pratique, cette étude permettrait de choisir, parmi les stades favorables au transfert celui qui est le mieux adapté par ses capacités de résistance.

D'un autre côté, après avoir observé que les gonocytes transférés proliféraient dans les ébauches gonadiques de l'hôte, il fallait établir s'il s'agissait réellement d'un phénomène de régulation. Cela avait aussi un intérêt pratique car seule une population normale de gonies garantirait le pouvoir reproducteur des sujets expérimentés. Ces deux problèmes ont été abordés grâce aux transferts interspécifiques de gonocytes.

A - DUREE DE LA COMPETENCE DES EBAUCHES GONADIQUES

1) INTRODUCTION

SIMON (1960 a) a démontré que le *territoire présomptif des glandes génitales* est seul compétent pour fixer les gonocytes qui se trouvent dans la circulation. En l'absence de territoire gonadique, les CGP demeurent dans les vaisseaux et aucun autre tissu embryonnaire ne peut les

retenir, alors que la région génitale conserve ce pouvoir même lorsqu'elle est détachée de l'ensemble de l'organisme et greffée dans une aire vasculaire. DANTCHAKOFF (1934) concevait la captation des gonocytes comme une "filtration" du sang artériel qui les contient par le réseau capillaire de la région gonadique. En altérant expérimentalement la morphologie vasculaire, SIMON (1960 a) a ruiné cette hypothèse et a été amenée à envisager la compétence des territoires gonadiques comme "un caractère intrinsèque des tissus qui exerceraient une attraction spécifique sur les cellules germinales". Cet auteur a pu mettre en évidence certains caractères de ce pouvoir attractif de l'épithélium germinatif et notamment son absence de spécificité zoologique qui a été confirmée depuis par les expériences de ROGULSKA, ODZENSKI et KOMAR (1971) et par mes propres travaux (cf. Chap. I et REYNAUD, 1969 a et b, 1970a et b). Cependant, SIMON n'a pas étudié la durée de cette compétence des ébauches gonadiques.

DUBOIS (1964, 1968 a), en associant en culture *in vitro* des ébauches gonadiques stériles à des fragments de croissant germinatif, a observé la colonisation de ces ébauches par des CGP émigrées du croissant, en l'absence de tout système vasculaire. Cette expérience a été ensuite reproduite *in vivo* par greffe intracoelomique (ROGULSKA, 1969). Ces résultats infirment de nouveau la thèse de la "filtration vasculaire" des gonocytes et corroborent, au contraire, celle de l'attraction chimique exercée par les ébauches gonadiques vis-à-vis des CGP (FIRKET, 1914 ; SWIFT, 1914 ; REAGAN, 1916). Les études biochimiques et ultrastructurales de CUMINGE et DUBOIS (1969) ont permis de confirmer l'existence de ce stimulus attractif émanant des épithéliums germinatifs et d'en préciser le caractère électif ainsi que la nature chimique probable (substances protéiques rejetées par un processus de type mérocrine). De plus, DUBOIS (1968 a) a pu déterminer l'époque de la perte de cette compétence *in vitro*, en associant en culture des gonades fertiles indifférenciées provenant d'embryons de 5 à 6 jours et demi d'incubation avec des régions gonadiques plus jeunes (2 jours et demi) et stériles. Les gonocytes primaires contenus dans la gonade fertile émigrent rapidement vers l'épithélium germinatif plus jeune de la crête génitale stérile. Pour l'auteur de ces expériences, "le fait que le jeune épithé-

lium germinatif provoque l'exode des gonocytes primaires hors d'une gonade de 5 jours d'incubation ... constitue une preuve, *a contrario*, de la décroissance, sinon de la disparition, du pouvoir attractif des épithéliums germinatifs avant le 5^e jour d'incubation". Il ressort, en outre, de travaux antérieurs du même auteur (DUBOIS, 1964) que ce pouvoir attractif serait déjà considérablement diminué dès le 4^e jour. Il resterait à savoir s'il en était de même *in ovo*.

2) METHODE EXPERIMENTALE

Des embryons de Poulet, dont le croissant germinatif a été irradié aux rayons ultraviolets aux stades 8⁺ à 10 HH, ont eu leur réseau vitellin injecté respectivement à 4, 5 et 6 jours d'incubation selon la technique décrite plus haut. Toutefois, le site de l'injection a dû être modifié pour les stades les plus tardifs. En effet, après le 4^e jour, les replis amniotiques antérieur, latéraux et postérieur ont complètement fusionné au-dessus de l'embryon, de sorte qu'il est nécessaire de percer le chorion pour atteindre le réseau vasculaire vitellin. De plus, comme l'embryon et l'allantoïde se sont considérablement développés, il devient indispensable, pour injecter dans une veinule assez éloignée de l'embryon, d'élargir la fenêtre qui a été percée pour l'irradiation ou d'en ouvrir une seconde sur le côté de la coquille. Ces opérations sont possibles jusqu'au 6^e jour d'incubation ; au-delà on ne peut plus atteindre les vaisseaux du sac vitellin sans déchirer la membrane chorio-allantoïdienne richement vascularisée et provoquer une hémorragie importante et généralement létale.

3) RESULTATS

Dans une série de 36 embryons stérilisés, 18 ont survécu parmi lesquels 6 ont été injectés à 4 jours, 6 autres à 5 jours et les 6 derniers à 6 jours d'incubation. 8 embryons sont morts aussitôt après l'injection ou dans les 12 heures suivantes dont 2 chez les sujets injectés à 4 jours et 3 dans chacun des deux autres groupes. Des contrôles histologiques,

des comptages et des mesures de cellules germinales ont été effectués chez les 10 embryons restants, récupérés et fixés à des stades divers entre 6 et 19 jours d'incubation. Les résultats ont été regroupés dans le *Tableau 6*.

a) Embryons injectés à 4 jours

Les 4 embryons examinés présentent dans leurs glandes génitales des cellules germinales d'aspect normal et dont la population est d'autant plus importante que le développement est plus avancé, comme chez les sujets injectés à 3 jours (cf. *Tableau 5*). Chez le sujet A₁ fixé à 6 jours, soit 48 heures après l'injection, le nombre de gonocytes primaires présents dans l'épithélium germinatif et dans le mésenchyme sous-jacent s'élève à 315, ce qui représente environ le quart de la population gonocytaire des embryons de Poulet normaux de même stade. La période de multiplication rapide des gonocytes n'ayant pas commencé chez ce spécimen, on a pu évaluer leur rapport nucléoplasmique : il est de 0,56, ce qui permet d'affirmer que l'on a bien affaire à des cellules germinales de Dindon introduites par injection et non à des gonocytes de Poulet qui auraient échappé ou survécu à l'irradiation du croissant germinal. Chez cet embryon de 6 jours, on n'a retrouvé aucun gonocyte en dehors des ébauches gonadiques, ce qui montre que leur colonisation est achevée. Elle s'est donc accomplie dans un délai inférieur à 48 heures bien que le volume du réseau circulatoire ait doublé depuis le stade où s'effectue la migration des CGP dans le développement normal (cf. RYCHTER *et al.*, 1955). Chez l'hôte A₄ qui a survécu le plus longtemps (jusqu'au 19^e jour) et qui était de sexe femelle, les 2 gonades ont été prélevées et fixées ; celle de droite a été seule examinée et comparée à la gonade abortive d'un embryon du même âge. Elle possédait une structure typique : épithélium germinatif aplati et stérile, cortex très réduit, medulla lacunaire du fait de la présence de nombreux cordons distendus. 98 cellules germinales ayant, comme chez le témoin, l'aspect de gonocytes primaires y ont été dénombrées (*Pl. VII, e*).

	Embryons injectés à 4 jours				Embryons injectés à 5 jours			Embryons injectés à 6 jours		
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	C ₂	C ₃
Embryon n°										
Age au moment de la fixation (en jours d'incubation)	6	8	12	19	9	11	19	9	12	19
Nombre de gonocytes primaires (ou de gonies)	315	3134	plusieurs milliers de gonies	98 gonocytes primaires dans la gonade droite	1450	0	0	0	0	0
Rapport N/P des gonocytes primaires	0,56	0,55								
Sexe de l'embryon	♀	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♂

Tableau 6 - Résultats des expériences d'injection différée

b) Embryons injectés à 5 jours

Les 3 embryons recueillis, tous de sexe femelle, ont fourni des résultats variables. L'un d'entre eux seulement (B1) présentait, 4 jours après l'injection, des ébauches gonadiques pourvues d'un nombre élevé de cellules germinales (1450), alors que les deux autres qui ont survécu davantage étaient absolument stériles. On ne peut attribuer l'absence de gonocytes à leur dégénérescence au contact d'un soma gonadique étranger car aucun vestige de cellule germinale n'a pu être décelé chez ces deux sujets.

Chez la femelle qui a survécu le plus longtemps (B3, fixée à 19 jours), le cortex ovarien stérile était nettement plus mince que chez les témoins de même stade, en dépit de la prolifération des cellules somatiques (*Pl. VII, f*).

c) Embryons injectés à 6 jours

Les 3 embryons examinés étaient complètement stériles. Le sujet qui a atteint le stade le plus avancé (C3, recueilli à 19 jours) était de sexe mâle et possédait des testicules un peu plus petits que la normale. Cette observation, jointe à la précédente (relative à B3), paraît indiquer que l'absence des gonies, à la différence de celle des gonocytes primaires, beaucoup moins nombreux, entraîne une diminution appréciable de la taille des gonades à la fin du développement embryonnaire (cf. Chapitre I, A/Discussion, d). Comme dans le lot expérimental précédent, on n'a décelé aucune trace de dégénérescence cellulaire à l'intérieur des ébauches gonadiques mâles ou femelles. On doit donc admettre que leur colonisation par les éléments germinaux injectés ne s'est pas effectuée parce que leur épithélium germinatif n'était plus compétent.

4) DISCUSSION

a) Il faut souligner, en premier lieu, qu'il paraît exclu que la stérilité constatée chez les sujets injectés à 5 et 6 jours soit due à

un échec de la technique de transfert. En effet, sa fréquence (5 cas sur 6) n'a rien de commun avec le pourcentage d'échecs enregistrés lors des injections précédentes (1 cas sur 20, soit 5 % : cf. *Tableau 5*).

b) La différence de comportement qui se manifeste chez les embryons injectés à 5 jours peut s'expliquer facilement. En effet, à cette période du développement, un décalage de plusieurs heures par rapport au stade évolutif normal (26 HH) peut passer totalement inaperçu au moment de l'injection, du fait de l'extension des annexes recouvrant l'embryon. Or, de tels décalages surviennent couramment chez les sujets expérimentaux par suite d'un retard plus ou moins important de leur développement déterminé par l'irradiation et le séjour hors de l'incubateur. De plus, les sujets d'une même série expérimentale étant traités les uns après les autres et les opérations de transfert étant assez longues et délicates, le dernier embryon de la série est injecté environ une heure plus tard que le premier. S'il est vraisemblable que la perte du pouvoir attractif de l'épithélium germinatif vis-à-vis des CGP n'est pas un phénomène brutal, un décalage de quelques heures peut néanmoins rendre compte des différences constatées chez les sujets d'une même série.

c) L'injection des CGP de Poulet à d'autres embryons de Poulet stérilisés, de 5 à 6 jours d'incubation, qui aurait permis d'évaluer la durée de la compétence des épithéliums germinatifs envers des gonocytes de la même espèce, n'a pas été tentée. Rappelons seulement que des transferts intraspécifiques de gonocytes primordiaux ont été faits plusieurs fois à 4 jours (voir Chap.I,p.58) et ont parfaitement réussi à ce stade.

En conclusion, il ressort que *la compétence des ébauches gonadiques - que l'on peut assimiler au pouvoir attractif des épithéliums germinatifs vis-à-vis des CGP - disparaît in vivo vers le 5^e jour d'incubation ce qui confirme les observations de DUBOIS (1968 a) faites in vitro*. Il est intéressant de noter que cette époque précède de peu la première poussée de cordons sexuels (à 5 jours 1/2 d'après SWIFT, 1916 et VENZKE, 1954), autrement dit avec le début d'une phase de prolifération et de différenciation cellulaires de l'épithélium germinatif (cf. REYNAUD, 1971 b).

B - REGULATION DES POPULATIONS DE GONOCYTES PRIMAIRES

La régulation des populations de CGP n'a été étudiée jusqu'à présent que dans le croissant germinale, à la suite d'expériences de fissuration longitudinale ou transversale du blastoderme (FARGEIX, 1967 a et b ; ROGULSKA, 1968). Il paraissait donc intéressant de savoir si le même phénomène intervenait dans les ébauches gonadiques des sujets injectés, déficitaires au départ en gonocytes primaires.

1) METHODES

Pour établir si les populations de CGP de Dindon qui colonisent les gonades stériles de Poulet sont le siège de phénomènes de régulation, il est nécessaire d'effectuer des comptages cellulaires à divers stades du développement chez des sujets expérimentés et chez des témoins.

Chez les embryons de Poulet normaux, on a déjà noté que les nombres de gonocytes primaires augmentaient régulièrement au cours du développement en doublant environ toutes les 24 heures entre les 4^e et 8^e jours d'incubation (*Tableau 1*). Ce taux de croissance est plus faible que celui trouvé par SIMON (1960 a) à des stades plus précoces (350 gonocytes à 75 heures contre 125 à 55 heures, soit un effectif presque triplé en 20 heures) - ce qui peut résulter d'un ralentissement momentané de l'activité mitotique - mais il est identique à celui qui ressort des comptages de VAN LIMBORGH (1961) entre 5 et 7 jours, chez le Canard.

Chez les sujets expérimentés, les populations de cellules germinales trouvées dans les ébauches gonadiques croissent également en fonction du temps d'incubation, ce qui se traduit notamment par des index de repeuplement germinale d'autant plus proches de l'unité que le stade de développement est plus avancé (*Tableau 5*).

Afin de pouvoir procéder à une comparaison précise et complète de

ces taux de croissance, seule susceptible de prouver l'existence d'un phénomène de régulation chez les sujets expérimentés, il restait à dénombrer les populations gonocytaires des embryons de Dindon normaux pris aux mêmes stades (22 à 34 HH). Des comptages ont donc été faits chez cette espèce, dans les mêmes conditions que pour les deux groupes précédents (voir : techniques cytologiques).

2) RESULTATS

Tous les résultats ont été réunis dans le *Tableau 7* où l'on a indiqué

Stade de développement (HH)	Nombre total de gonocytes primaires par embryon		
	Poulets normaux	Dindons normaux	Poulets injectés
22	372	181	59
			62
26	416	205	87
	671	322	125
	736	390	152
29			167
	1150 (♂)	771	504 (♀)
	1292 (♂)	889	532 (♂)
31			650 (♀)
	2003 (♀)	1567 (♂)	1489 (♂)
34	2255 (♀)	1650 (♀)	1508 (♀)
	4013 (♂)	3436 (♂)	3069 (♀)
	4498 (♀)	3606 (♀)	3307 (♀)

Tableau 7 - Résultats des comptages de gonocytes chez des embryons normaux et injectés de mêmes stades.

en plus des populations gonocytaires correspondant à chaque stade, le sexe des embryons dont les gonades étaient différenciées. On peut signaler à ce sujet que chez les trois groupes étudiés (Poulets normaux, Poulets expérimentés, Dindons normaux), les nombres de gonocytes sont presque toujours supérieurs chez les femelles, ce qui avait déjà été noté par VAN LIMBORGH (1968) chez l'embryon de Poulet. Les résultats ont été reportés sur un graphique à coordonnées semi-logarithmiques (*Fig. 6*) qui facilite la comparaison des types de croissance des trois populations gonocytaires.

Chez les embryons normaux de Dindon et de Poulet, les valeurs obtenues pour chaque stade sont bien regroupées et les points correspondants sont pratiquement alignés d'un bout à l'autre de la période de développement étudiée. Cela prouve que la croissance normale des populations gonocytaires des deux espèces est exponentielle durant toute cette période (cf. REYNAUD, 1969 b et 1971 a). Cependant, les deux droites tracées n'ont ni la même ordonnée à l'origine, ni la même pente. On peut en déduire que la population des gonocytes de Poulet est plus dense au départ mais prolifère moins activement que celle du Dindon. Néanmoins, entre les stades 22 et 34 HH, les nombres de cellules germinales de Dindon restent inférieurs à ceux du Poulet.

Chez les sujets injectés, le nombre de gonocytes au départ (stade 22 HH, à 4 jours) est nettement inférieur à celui des témoins des deux espèces. Cependant, leur multiplication est beaucoup plus rapide si bien qu'au stade 31 HH (7 jours), la population gonocytaire est pratiquement la même que celle des embryons normaux de Dindon (autour de 1500 cellules). A partir de ce moment, la prolifération des cellules germinales chez les embryons de Poulet expérimentés subit un brusque ralentissement pour se faire au même rythme que chez les embryons de Dindon. Les droites traduisant les variations d'accroissement des deux populations acquièrent la même pente et ne maintiennent entre elles qu'une très légère différence d'ordonnées (inférieure à 10 %). Les populations de gonocytes de Dindon transférés

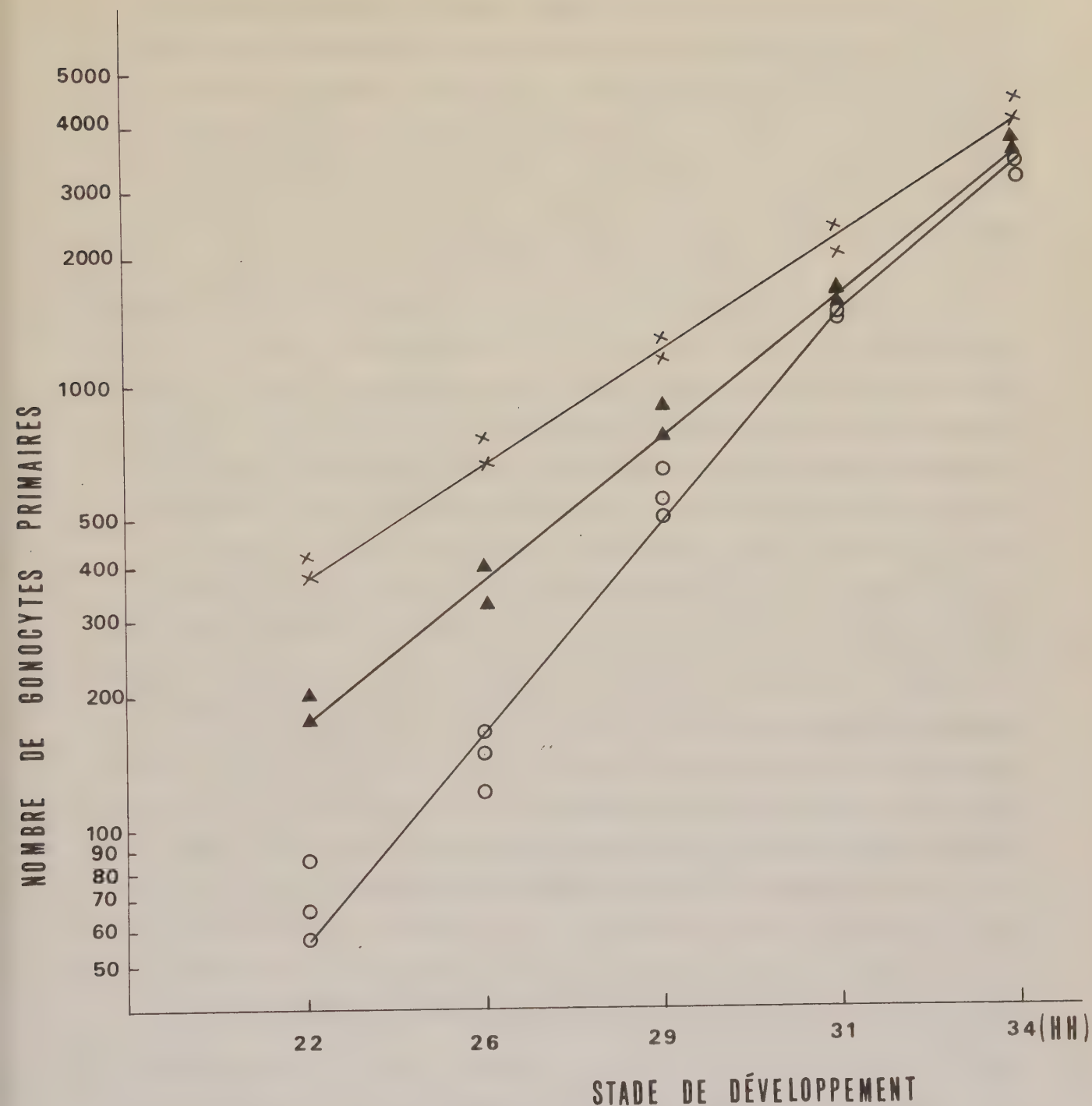


Figure 6 - Variation du nombre de gonocytes primaires au cours du développement chez des embryons de Poulet normaux (croix), chez des embryons de Dindon normaux (triangles) et chez des embryons de Poulet injectés (cercles).

sont donc bien le siège d'une régulation dont l'existence est encore confirmée par le fait que la dispersion des points correspondant à ces populations s'atténue progressivement et devient négligeable à partir du stade 31 HH (7 jours). Cette régulation se fait conformément à l'origine spécifique des gonocytes et elle ne nécessite que 3 jours pour s'accomplir puisque les CGP, injectées à 3 jours d'incubation, séjournent environ 24 heures dans le sang sans se diviser.

3) DISCUSSION

a) Comme on l'a dit plus haut, on ne peut comparer ce phénomène de régulation qu'à celui étudié par FARGEIX (1967 a et b) chez l'embryon de Canard. A la suite de la fissuration longitudinale ou transversale de la blastula non incubée, les embryons qui se développent à partir de moitiés latérales ou antérieures acquièrent au cours des 30 premières heures d'incubation - et quelquefois dès le stade de la ligne primitive moyenne - des populations de CGP aussi nombreuses que celles des embryons normaux de même stade. Pour FARGEIX, cela implique une régulation rapide et totale, par divisions mitotiques accélérées, du nombre des gonocytes primordiaux présents dans chacune des moitiés de blastoderme. Dans la mesure où l'on peut comparer des résultats fournis par des espèces différentes, la régulation serait donc plus rapide dans le croissant germinale que dans les ébauches gonadiques où elle nécessite un délai de 72 heures pour s'accomplir. Pour ROGULSKA (1968) cependant, qui a repris les mêmes expériences de fissuration, le doublement du nombre des CGP, qu'elle a aussi constaté, ne serait pas dû à leur multiplication mais à une stimulation de leur production par l'endoblaste, consécutive à la fissuration du blastoderme.

b) On peut s'interroger sur les limitations que pourrait imposer le soma gonadique à la rétention et à la prolifération du germen. SIMON (1960), après avoir mis en parabiose circulatoire un embryon privé de sa région gonadique et un embryon normal, a constaté que les CGP provenant des 2 croissants germinaux - et donc deux fois trop nombreuses pour un

seul individu - ne sont pas toutes retenues par l'épithélium germinatif de l'embryon entier. Celui-ci n'en reçoit qu'une quantité normale (de 100 à 175) et les CGP en excès restent dans le sang puis dégénèrent. On doit donc admettre, comme SIMON, qu'il existe une *limite précise aux capacités d'hébergement de l'épithélium germinatif*, au moment de sa colonisation par les CGP. Or, dans mes propres expériences, le diamètre des gonocytes primordiaux est presque une fois et demie plus grand (et donc leur volume trois fois plus grand) chez le Dindon que chez le Poulet (cf. *Tableau 4*). En conséquence, il est vraisemblable que si l'on injectait à l'embryon de Poulet de 3 jours un nombre de CGP de Dindon égal à celui que contient le croissant germinatif (150 à 200), ses ébauches gonadiques seraient incapables de toutes les fixer. Elles n'en retiendraient sans doute que le tiers environ (50 à 80 cellules), ce qui nous replacerait dans les mêmes conditions que celles qui ont été créées jusqu'ici.

L'examen du graphique (*Fig. 6*) montre clairement qu'après la colonisation des crêtes génitales, les populations de gonocytes transférés régulent leur prolifération en fonction de leurs caractéristiques spécifiques, ce qui exclut apparemment tout effet provenant du soma gonadique. D'un autre côté, il n'est pas impossible que les tissus corticaux et médullaires soient capables de régler leur propre activité mitotique en fonction du volume occupé par les éléments germinaux. En effet, on n'a noté aucune augmentation flagrante de la taille des gonades des sujets injectés de 7 à 8 jours (stades 31 et 34 HH) bien qu'elles contiennent un volume excédentaire de gonocytes primaires.

c) On a constaté, chez des individus incomplètement stérilisés (cf. *Tableau 2*) ou chez lesquels le transfert de CGP avait échoué (cf. *Tableau 5*), que quelques gonocytes primaires, bien que d'aspect normal, semblaient avoir perdu la faculté de se diviser. D'autre part, ROGULSKA (1969), à la suite de greffes intracoelomiques de portions de croissant germinatif, ne permettant de transférer qu'une vingtaine de CGP, n'a jamais constaté leur prolifération au cours des 30 heures suivant le transfert. Il semblerait

donc que les mitoses - et, par suite, la progression de la différenciation - ne puissent être obtenues qu'avec une "concentration" minimum de gonocytes, ce qui ressort d'ailleurs des expériences de culture de fragments d'ébauches ovariennes : lorsque les cellules germinales sont isolées ou en petits groupes, elles dégènèrent rapidement alors qu'elles prolifèrent et se différencient quand elles sont plus nombreuses (JORDANOV *et al.* 1965). Ces phénomènes ne sont pas sans rappeler l'évolution des cultures de cellules en milieu nutritif, qui est conditionnée par les substances qu'elles libèrent (allélocatalyse). Pour un volume donné de milieu, il faut au départ un nombre minimum de cellules et leur population ne peut ensuite dépasser une certaine valeur qui est spécifique des cellules considérées.

En définitive, si les gonocytes doivent certainement à la gonade leur survie et leur option pour la lignée séminale ou ovulaire, il apparaît que leur prolifération est réglée essentiellement par des facteurs intrinsèques.

RESUME

1. L'épithélium germinatif stérile de l'embryon de Poulet est capable d'attirer et de fixer les gonocytes primordiaux introduits dans sa circulation sanguine jusqu'au 5^e jour d'incubation (stade 26 HH). Cette compétence disparaît aussitôt après ce stade, c'est-à-dire au moment même où les éléments somatiques de l'épithélium germinatif prolifèrent (pour former les cordons sexuels de première poussée) et amorcent leur différenciation.
2. Les gonocytes primordiaux de Dindon qui se fixent dans les ébauches gonadiques de Poulet sont en nombre réduit par rapport aux populations germinales normales des deux espèces, au terme de leur colonisation. Cependant, ils prolifèrent de façon accélérée, de sorte qu'en trois jours de délai, leur nombre rejoint celui de la population germinale des embryons de Dindon témoins. Après cette régulation, leur population évolue conformément à cette dernière espèce. Cela laisse supposer que les facteurs qui limitent l'expansion d'une population de gonocytes n'émanent pas des gonades mais lui sont intrinsèques.

CHAPITRE III

TRANSFERTS INTERSPECIFIQUES DE CGP. CARACTERES SEXUELS ET POUVOIR REPRODUCTEUR DE POULETS PORTEURS D'UN GERME DE DINDON

Au cours des dernières séries de transferts interspécifiques de CGP, j'ai utilisé comme hôtes des embryons de Poulet très résistants provenant du métissage entre coqs RIR (M₄₄) et poules WB (M₁₁). De plus, ils ont été injectés exclusivement au 4^e jour d'incubation, c'est-à-dire à un stade où la mortalité est relativement peu élevée en incubation artificielle. Enfin, les oeufs ont été humectés au terme de l'incubation et les poussins ont été aidés au maximum au moment de l'éclosion. Dans ces conditions, 3 individus ont pu éclore dans un lot de 35 embryons qui avaient reçu par voie intraveineuse, après stérilisation par les rayons ultraviolets, des CGP de Dindon (cf. REYNAUD, 1971,c)

A - PHENOTYPE ET CARACTERES SEXUELS DES SUJETS EXPERIMENTES

1) SUJETS MALES

Phénotype et caractères sexuels secondaires

Le premier poussin mâle [M (g) ♂ n°1] a éclos le 13.5.70. Son aspect était assez proche de celui des hybrides mâles normaux de même origine : fond de duvet blanc avec des bandes médio-dorsales parallèles noires ou gris chiné et quelques *praepennae* noires sur le bord des ailes

et en arrière des yeux (*Pl. VIII, a*). Toutefois, sa crête était simple, conformément au génotype de RIR, (comme chez certains hybrides RW de la 2^e génération). Son poids à la naissance était de 40 grammes. Ce sujet a acquis, en temps normal, les attributs caractéristiques de son sexe : chant et instinct batailleur, crête dressée et turgescente, barbillons, ergots, plumage différencié (*Pl. VIII, b*). Mis en présence de poules, il a commencé à les cocher à l'âge de 5 mois et demi.

Le second poussin mâle [M (g) ♂ n°2] est né le 30.6.70. Son phénotype était très voisin du précédent et absolument conforme à celui des hybrides mâles RW de F₁, avec notamment une crête rosacée (*Pl. VIII, c*). Les doigts de sa patte gauche étaient crochus et cette malformation a persisté définitivement. Cet individu pesait 42 grammes à la naissance. En quelques mois, il a développé des caractères sexuels secondaires normaux (*Pl. VIII, d*) et il a commencé à cocher les poules à l'âge de 6 mois.

Gamètes et caractères sexuels accessoires

Afin de contrôler la fertilité du sperme des sujets expérimentés, on a procédé à des massages de leur région pelvienne (cf. technique d'insémination artificielle). Le liquide spermatique ainsi recueilli a été examiné à l'état frais : il renfermait de nombreux spermatozoïdes très mobiles. L'examen de frottis colorés a montré que *ces spermatozoïdes possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux du Dindon* (cf. SCHWEIGER - SEIDEL, 1866 ; ALTMAN et DITTMER, 1962). En effet, comme chez cette espèce, leur tête est moins arquée et un peu plus longue que chez le Poulet (13 μ au lieu de 11, en moyenne), bien que leur longueur totale soit la même dans tous les cas (85 μ) (*Pl. IX, a, b, c*).

L'un des coqs [M (g) ♂ n°2] a été sacrifié à l'âge de 2 ans. Son appareil génital était parfaitement normal (*Pl. IX, d*); ses testicules et ses canaux déférents contenaient une quantité considérable de spermatozoïdes (*Pl. IX, e, f*).

2) SUJET FEMELLE

Phénotype et caractères sexuels secondaires

Eclos le 1.07.70, le 3^e sujet [M(g) ♀] avait un aspect tout-à-fait conforme à celui des hybrides femelles normaux de même origine : duvet rouge brun clair avec des bandes noires sur le dos et une tache noire en arrière de l'oeil (Pl. XII, a). Sa crête était simple ; son poids était de 38 grammes. Au terme d'un délai normal, cet individu a acquis une morphologie et un comportement caractéristiques du sexe femelle (Pl. XII, b) et a commencé à pondre à l'âge de 6 mois.

Gamètes et caractères sexuels accessoires

Tous les oeufs pondus étaient normalement constitués. Leur jaune avait une taille normale mais présentait, dans un tiers des cas environ, un aspect marbré dû à des taches claires, de formes diverses, localisées surtout à l'équateur et dans l'hémisphère végétatif. La présence de ces marbrures, jamais rencontrées chez les oeufs frais de poules normales, suggère une perturbation de la vitellogenèse, du moins dans sa phase terminale.

La fréquence de la ponte a atteint une valeur courante (2 oeufs tous les 3 jours environ) lorsque la poule est parvenue à l'âge de 8 mois. Ce rythme s'est maintenu pendant 4 mois et demi (Mars-Juillet 1971), puis il a baissé fortement et la ponte a été suspendue au début de Septembre. Après avoir subi pendant 3 mois (Novembre 1971 - Janvier 1972) des injections intramusculaires hebdomadaires de benzoate d'oestradiol (0,25 mg/semaine le 1^{er} mois, 0,50 le 2^e et 1 mg le 3^e) qui n'ont donné aucun résultat, l'animal a été sacrifié le 8.05.72. Le tractus génital était absolument normal (Pl. XII, c) mais l'ovaire, de taille réduite, ne contenait que de petits follicules n'excédant pas 8 mm de diamètre (Pl. XII, d). Leur étude histologique n'a rien révélé de particulier si bien que le mécanisme de leur blocage demeure inconnu (Pl. XII : e, f).

B - RESULTATS DES CROISEMENTS ENTRE SUJETS NORMAUX ET EXPERIMENTES

Tous les croisements ont été faits sous une surveillance rigoureuse et permanente (cf. Techniques d'élevage). Afin de mieux suivre le développement, une fenêtre a été pratiquée, à 2 jours d'incubation, dans la coquille des 5 premiers oeufs pondus. Ceux qui montraient un embryon vivant étaient maintenus en couveuse et examinés deux fois par jour. Toutefois, l'ouverture d'une fenêtre pouvant perturber le développement (ANCEL, 1956), tous les oeufs pondus ultérieurement ont été mirés à 3 jours d'incubation et ouverts systématiquement lorsqu'aucune circulation vitelline n'y apparaissait.

L'absence de fécondation a été contrôlée par la technique de KOSIN (1944). Les blastoderms bloqués à un stade précoce de leur développement et les embryons morts avant le stade 20 HH ont été prélevés *in vitro*, puis fixés et colorés *in toto* (technique de SHUMWAY et ADAMSTONE, 1958). Les embryons plus âgés ont été détachés de l'aire vasculaire et fixés au Bouin.

1) CROISEMENTS ENTRE INDIVIDUS DE MEME SOMA

a) Croisement entre coq expérimenté et poule normale / M(g) x G /

Les femelles utilisées dans ce croisement étaient des poules jeunes et de même origine (RW, F₁ ou F₂) que les sujets expérimentés, ayant déjà été testées pour leur fécondité par accouplement avec des coqs normaux. Au début des présentes expériences, elles avaient été séparées de ceux-ci depuis au moins 5 semaines. Chacun des deux coqs expérimentés n'a été accouplé qu'à une seule poule.

- Descendance du coq M(g) ♂ n°1

La mise en présence des partenaires a eu lieu à la fin du mois d'Octobre 1970. En 3 mois, durant lesquels des coïts fréquents ont pu être observés, la poule a pondu 62 oeufs dont 60 ont été mis à couver. Les résultats obtenus peuvent se répartir en trois catégories.

14 oeufs, soit environ 25 %, n'étaient pas fécondés. Ce pourcentage est anormalement élevé puisqu'il n'excède jamais 6 % chez des progéniteurs jeunes et sains (ROMANOFF, 1960). La stérilité des oeufs ne peut pas être attribuée à l'immaturité du mâle au début de la période d'appariement car elle a été constatée tout au long de celle-ci.

18 oeufs montraient simplement une *extension du disque germinatif*, résultant sans doute d'une prolifération cellulaire anarchique conduisant à la formation de "membranes". 5 d'entre eux seulement présentaient des îlots sanguins.

Enfin, 28 embryons se sont développés mais n'ont jamais franchi le 5^e jour d'incubation (stade 26 HH). 15 d'entre eux avaient un aspect normal ; les 13 autres étaient *anormaux*.

Les anomalies les plus graves se traduisent par une altération profonde de la forme et une simplification des structures (absence de vésicules céphaliques et de somites mésodermiques) empêchant toute détermination du stade embryonnaire (8 cas). Cependant, la présence constante d'îlots sanguins colorés prouve que le développement s'est poursuivi pendant plus de 24 heures (*Pl. X : a, b*).

D'autres anomalies sont moins importantes et permettent de reconnaître les principales structures embryonnaires plus ou moins malformées : coeur hypertrophié, tube neural brusquement infléchi en arrière de l'encéphale, prolifération anarchique des somites (2 cas dont celui de la *Pl. X, c*).

Enfin, certains embryons, de constitution apparemment normale, présentent seulement un défaut de croissance entraînant une réduction harmonieuse de la taille pouvant atteindre 20 % (3 cas dont celui de la *Pl. X, d*). Le spécimen qui a atteint le stade de développement le plus avancé (26 HH) était un microembryon.

- Descendance du coq M(g) ♂^{n°2}

Le deuxième coq issu d'un embryon expérimenté a été mis en présence d'une poule à la mi-décembre 1970. Celle-ci a pondu au cours des deux mois suivants 40 oeufs dont 39 ont été incubés et examinés. *On y a retrouvé les mêmes catégories de résultats et les mêmes anomalies que dans la descendance du coq M(g) ♂^{n°1}.*

9 oeufs, pondus à divers moments de la période d'accouplement, n'étaient pas fécondés. 13 oeufs présentaient un disque germinatif dilaté mais inorganisé et comportant des îlots sanguins dans 3 cas seulement. Enfin, 17 oeufs montraient des embryons n'ayant jamais dépassé le stade 20 HH (3 jours d'incubation), parmi lesquels 10 étaient anormaux.

Sur ces 10 spécimens, 5 présentaient des anomalies majeures se rapprochant de celles décrites plus haut (*Pl. XI : a, b*) avec en outre, dans un cas, une flexion à angle droit de l'axe embryonnaire (*Pl. XI, a*). Les 5 autres individus montraient des anomalies mineures dont 2 cas de malformation plus ou moins importante des vésicules céphaliques (*Pl. XI : c, d*) et 3 cas de microembryonie.

Comparaison de ce croisement avec l'hybridation dindon x poule (M x G)

L'absence de descendance viable confirme que les spermatozoïdes élaborés par les coqs expérimentés ne proviennent pas de gonocytes de l'hôte ayant échappé à la destruction du croissant germinale par les rayons ultraviolets et ayant repeuplé les gonades, mais bien des cellules germinales de Dindon introduites par injection intravasculaire. Dans la mesure où celles-ci pourraient conserver intacts leurs caractères spécifiques dans un soma étranger, les accouplements rapportés ci-dessus sont assimilables au croisement entre dindon et poule (*Meleagris gallopavo* ♂ x *Gallus domesticus* ♀). Ce croisement a été tenté à plusieurs reprises au moyen de la technique d'insémination artificielle (WARREN et SCOTT, 1935 ; QUINN, BURROWS et BYERLY, 1937 ; RYLE et SIMONSEN, 1956 ; ASMUNDSON et LORENZ, 1957 ; KEMPENICH-PINTO et al., 1970). Les pourcentages d'oeufs de poule fécondés par les

spermatozoïdes de dindon sont situés entre 0 % (RYLE et SIMONSEN, 1956) et 40 % (KEMPENICH-PINTO *et al.*, 1970) mais, le plus fréquemment, entre 1 et 5 %. Dans le croisement étudié ici, le taux d'oeufs fécondés est considérablement plus élevé puisqu'il atteint 75 % environ dans les deux cas. Par ailleurs, le blocage du développement chez les rares embryons fournis par l'hybridation entre dindon et poule (6 mentionnés en tout par les auteurs) intervient au plus tard à 3 jours d'incubation (WARREN et SCOTT, 1935 ; QUINN, BURROWS et BYERLY, 1937) ou, exceptionnellement, à 5 jours (KEMPENICH-PINTO *et al.*, 1970) c'est-à-dire exactement comme dans les présentes expériences.

WARREN et SCOTT (1935) ont, de plus, fait état d'anomalies de forme et de taille chez l'unique embryon de 3 jours qu'ils ont obtenu, mais ces anomalies ne sont pas décrites de façon précise et ne peuvent donc pas être comparées à celles que j'ai observées. Néanmoins, cette confrontation de données met en évidence le fait que, dans les accouplements de coqs expérimentés et de poules normales, *les résultats* (fécondation des oeufs, développement embryonnaire précoce) *sont améliorés quantitativement par rapport à l'hybridation interspécifique, mais non qualitativement puisque les développements sont bloqués dans les mêmes conditions.* L'augmentation du nombre des oeufs fécondés dans le croisement étudié peut être dû au fait que l'insémination étant naturelle et le liquide séminal de même spécificité (*Gallus*) que l'oviducte, les spermatozoïdes parviennent sans doute en plus grand nombre et en meilleur état au niveau du pavillon génital. Par contre, le blocage précoce du développement embryonnaire qui a une cause génétique directe (cf. OHNO, 1969) se produit ici de la même façon que dans l'hybridation interspécifique. Cette constatation, jointe aux résultats de l'étude morphologique des spermatozoïdes, tendrait à démontrer que les gonocytes de Dindon transférés à des embryons de Poulet mâles se sont différenciés conformément à l'information contenue dans leur noyau et n'ont pas été modifiés par le soma étranger qui les a hébergés et nourris. En fait, si le cytoplasme des spermatocytes et des spermatides d'origine *Meleagris* a incorporé des substances provenant du soma de *Gallus*, il les a probablement éliminées en majeure partie durant la spermiogenèse.

b) Croisement entre coq normal et poule expérimentée /G x M(g)/

On a utilisé pour ce croisement un coq jeune mais ayant déjà fait la preuve de sa fécondité lors d'accouplements avec des poules normales. La mise en présence des partenaires a eu lieu en Janvier 1971, au début de la période de ponte de M(g) ♀. En un mois et demi, au cours duquel de nombreuses saillies ont pu être observées, la femelle a pondu 28 oeufs que l'on a mis à incuber et qui ont été contrôlés. On a retrouvé les deux premières catégories de résultats obtenus au cours du croisement réciproque, à savoir des *oeufs non fécondés* (22 sur 28, soit plus des 3/4) et des oeufs montrant une *croissance anarchique du disque germinatif*, sans aucune différenciation d'îlots sanguins (6 sujets). Dans 9 cas correspondant à des oeufs fécondés ou non, le jaune se présentait sous l'aspect marbré décrit précédemment.

Comparaison de ce croisement avec l'hybridation coq x dinde (G x M)

L'absence de descendance démontre ici encore que les ovules de la poule expérimentée proviennent effectivement des gonocytes primordiaux de Dindon qui lui ont été injectés pendant la vie embryonnaire. On peut donc rapprocher l'accouplement décrit ci-dessus du croisement entre coq et dinde (*Gallus domesticus* ♂ x *Meleagris gallopavo* ♀). Celui-ci, comme l'hybridation réciproque, a fait l'objet de nombreuses expériences utilisant l'insémination artificielle (WARREN et SCOTT, 1935 ; SOKOLOVASKAYA, 1935 ; QUINN, BURROWS et BYERLY, 1937 ; RYLE et SIMONSEN, 1956 ; ASMUNDSON et LORENZ, 1957 ; OLSEN, 1960 ; TANG-YUAN LEE, 1965). Les pourcentages d'oeufs fécondés produits par ce croisement se situent entre 0 % (SOKOLOVASKAYA, 1935) et 60 % (OLSEN, 1960) mais, si l'on exclut ce dernier résultat, - obtenu grâce à des races de progéniteurs sélectionnées pour leur taux élevé de développement parthénogénétique - la moyenne se situe autour de 20 %. *Ce pourcentage est à peu près le même que celui fourni par mes expériences.* Par contre, dans l'hybridation, le pourcentage d'embryons développés à partir des oeufs fécondés varie entre 30 et 60 %, ce qui est très nettement supérieur au résultat du présent accouplement. En outre, certains hybrides peuvent

atteindre le stade de l'éclosion (QUINN, BURROWS et BYERLY, 1937 ; ASMUNDSON et LORENZ, 1957) et même le franchir pour survivre pendant quelques mois (OLSEN, 1960 ; TANG-YUAN LEE, 1965).

Dans le croisement étudié ici, l'insémination est naturelle et le liquide séminal de même spécificité que l'oviducte. On retrouve donc les mêmes conditions que dans le croisement précédent et on pouvait donc s'attendre à des résultats améliorés par rapport à l'hybridation interspécifique. Or, il n'en est rien puisque le taux de fécondation est aussi faible et la létalité embryonnaire constamment plus précoce. Si un phénomène intervient réellement après la pénétration des spermatozoïdes pour renforcer le blocage de l'amphimixie ou du développement, il ne peut résulter que d'une modification quelconque de l'ovocyte de *Meleagris* par le soma de *Gallus* qui l'a hébergé et nourri (cf. discussion, b). L'aspect anormal du vitellus observé chez plusieurs oeufs de la poule M(g) ♀ pourrait être un indice de cette modification.

2) CROISEMENTS ENTRE INDIVIDUS DE MEME GERME

Les croisements interspécifiques (*Gallus* x *Meleagris*) requièrent l'emploi d'une technique d'insémination artificielle (voir : Techniques d'élevage). Les inséminations, faites à la fin du printemps et à l'automne 1971, ont été bi-hebdomadaires pendant les deux premières semaines, puis hebdomadaires. Les dindons utilisés étaient de même race (Petit Blanc de Beltsville, souche BETINA) que les embryons qui ont fourni les gonocytes lors des transferts.

a) Croisement entre coq expérimenté et dinde normale [M(g) x M]

On a employé pour ces croisements une jeune dinde contrôlée pour sa fécondité mais isolée des mâles depuis plus de 6 mois. Avant de commencer les inséminations, un contrôle des oeufs vierges a été fait pour évaluer l'importance de la parthénogenèse, connue chez la Dinde (OLSEN et MARSDEN, 1956). Entre le 1er et le 16.05.71, l'animal a pondu 14 oeufs qui ont été

mis à incuber et ouverts au bout de 3 jours. 12 d'entre eux ne présentaient aucune trace de développement, tandis que les 2 autres montraient un très léger élargissement de la cicatricule, sans îlots sanguins et sans embryon.

- Descendance du coq M(g) ♂ n°1

Les expériences d'insémination ont commencé le 17.05.71 et ont été répétées ensuite chaque semaine pendant un mois et demi. Durant cette période, la dinde a pondu 16 oeufs dont le premier a été recueilli 4 jours après la 1ère insémination et le dernier le lendemain de la 7è. Sur ces 16 oeufs, mis à couvrir et ouverts après mirage à 3 jours d'incubation, *13 n'étaient pas fécondés*. Les 3 autres montraient un *élargissement du disque germinatif*, semblable à ceux rapportés ci-dessus, sans embryons et sans îlots sanguins. Ces 3 spécimens ont été fixés et colorés après section dans le but de détecter la présence éventuelle de spermatozoïdes. Malheureusement, la surcharge vitelline des cellules qui ont proliféré à partir de la cicatricule a empêché de les observer.

- Descendance du coq M(g) ♂ n°2

La dinde utilisée pour le croisement ci-dessus, tenue à l'écart de toute volaille mâle depuis le 30.06.71, a recommencé à pondre le 22.10. Elle a été inséminée aussitôt avec du sperme provenant du coq M(g) ♂ N°2. L'insémination a été répétée ensuite chaque semaine jusqu'au nouvel arrêt de la ponte (29.11), soit pendant une période de 38 jours au cours de laquelle la dinde a été inséminée 5 fois et a pondu 15 oeufs. Sur ces 15 oeufs, mis à couvrir et contrôlés à 3 jours d'incubation, *13 ne présentaient aucun indice de développement*. Les 2 autres montraient un *disque germinatif légèrement élargi*, sans îlots sanguins et sans embryon. Comme dans le croisement précédent, il n'a pas été possible de savoir si des spermatozoïdes avaient pénétré dans la cicatricule.

Comparaison avec l'accouplement normal du dindon et de la dinde

Les résultats de ces croisements peuvent paraître paradoxaux, de prime abord. En effet, le croisement de coqs expérimentés avec des poules normales semblait montrer que les spermatozoïdes issus des gonocytes de Dindon, bien qu'hébergés et nourris par un soma de Poulet, conservaient leurs caractères spécifiques. Théoriquement, ils devraient donc être capables d'assurer la fécondation et le développement normal des oeufs de dinde. Or, le taux de fécondation est ici très faible (16 %) et on n'est même pas assuré qu'il y ait eu effectivement amphimixie plutôt qu'une simple activation de l'oeuf suivie de parthénogenèse dans deux ou trois cas. Il faut donc examiner les causes probables de cet échec.

On peut tout d'abord incriminer la technique d'insémination. On sait en effet qu'à la suite de son emploi les spermatozoïdes ne parviennent pas toujours en nombre suffisant jusqu'au pavillon de l'oviducte (LORENZ, 1959). Il serait toutefois assez surprenant que cela se soit produit à tous les coups, d'autant que l'insémination réciproque a été réussie dès le départ (voir plus bas).

On peut aussi mettre en cause le matériel biologique, c'est-à-dire le sperme des coqs expérimentés. On a déjà vu que leurs spermatozoïdes, d'origine *Meleagris*, faisaient preuve d'un pouvoir fécondant élevé vis-à-vis des oeufs de *Gallus* (cf. I, a). La perte de ce pouvoir envers les oeufs de *Meleagris* pourrait être due à une modification de leur acrosome dont les granules formateurs auraient incorporé des substances de *Gallus*, élaborées ou transmises par les cellules de Sertoli. Par suite, la réaction acrosomiale, rendue possible au contact des ovocytes de poule, serait inhibée au contact des ovocytes de dinde. D'un autre côté, l'examen d'échantillons de sperme avant insémination a montré que le liquide séminal, de spécificité *Gallus*, n'altérerait absolument pas la motilité des spermatozoïdes d'origine *Meleagris* qu'il contient. Par la suite, il pourrait cependant empêcher leur capacitation sous l'effet de substances émises par le tractus génital de la dinde. Cette entrave ne saurait pourtant être supérieure à celle qui intervient dans l'hybridation entre coq et dinde

(G x M) où 20 % des oeufs sont fécondés. On doit donc admettre, en définitive, que ces trois causes possibles de la stérilité des oeufs ont pu jouer indépendamment l'une de l'autre et même être renforcées par d'autres (cf. discussion, p.93).

b) Croisement entre dindon normal et poule expérimentée /M x M(g)/

Le dindon utilisé pour ce croisement était un animal jeune (2 ans) ayant déjà fait la preuve de sa fécondité lors d'accouplements avec des dindes normales. Dès son premier massage, du liquide séminal riche en spermatozoïdes a pu être recueilli et a été utilisé aussitôt pour la première insémination de la poule M(g) ♀. Celle-ci a reçu en tout 10 injections intra-utérines de sperme (+ 0,13 cm³ chaque fois) entre le 28.04 et le 4.07.71. Elle a pondu 38 oeufs pendant cette période, dont le premier dès le lendemain de la première insémination et le dernier 6 jours après la dernière. 36 d'entre eux ont été mis à couvrir et contrôlés par un premier mirage à 3 jours d'incubation. Ceux qui présentaient une aire vasculaire normalement développée étaient ensuite mirés quotidiennement.

Sur les 36 oeufs examinés, 25 *n'étaient pas fécondés*. Excepté 1'un d'eux, pondu dès le lendemain de la première insémination, tous ont été observés après la 5^e injection de sperme, soit 3 semaines au moins après le début des expériences. Par ailleurs, 13 oeufs présentaient les marbrures du vitellus décrites plus haut ; ils correspondaient soit à des oeufs non fécondés (11 cas), soit à des oeufs bloqués précocement et anormaux (2 cas). Parmi les 11 oeufs fécondés, 3 présentaient un *disque germinatif élargi*, sans îlots sanguins et sans embryon ; 2 autres montraient un *disque élargi portant des îlots sanguins* ; enfin, 6 oeufs présentaient des *embryons plus ou moins développés*. Le plus jeune, de stade indéterminable, était un microembryon informe situé au centre d'une aire vasculaire bien développée (correspondant à 40 heures d'incubation environ par son diamètre) et enfermé dans un sac amniotique entièrement clos (Pl. XIII, a). Le second, bloqué au stade 17 HH (2 jours et demi

d'incubation environ), présentait une *spina bifida* au niveau du point de départ des artères omphalo-mésentériques (Pl. XIII, b). Les 4 derniers ont dépassé le 8è jour d'incubation et méritent d'être décrits en détail.

Embryon MM(g) n°1 (récupéré le 9è jour ; mort la nuit précédente) :

son degré de développement correspondait au stade 32 HH, atteint à 7 jours et demi d'incubation chez le Poulet et à 10 jours chez le Dindon (REYNAUD, 1972). Il était donc retardé d'environ 24 heures par rapport au développement normal de *Gallus*, mais en avance de 36 heures sur celui de *Meleagris*. A ce stade, le duvet néoptile et les appendices céphaliques (crête du Poulet, caroncule du Dindon) n'étant pas encore formés, il n'a pas été possible de savoir si le phénotype de cet embryon était ou non conforme à celui de son génotype d'origine (*Meleagris*). Sa taille était toutefois plus proche de celle du Poulet que de celle du Dindon (Pl. XIII, c).

Embryons MM(g) n°2 et 3 (recueillis le 10è jour ; morts dans les 12 heures précédentes).

Leur aspect - et la conformation de leur membre antérieur notamment - correspondait au stade 34 HH, atteint à 8 jours d'incubation chez le Poulet et à 11 jours chez le Dindon. La vitesse de développement était donc encore intermédiaire par rapport à celles des deux espèces. Les appendices céphaliques et le duvet n'étaient apparus chez aucun des deux embryons. L'embryon n°3 avait une forme parfaitement normale (Pl. XIII, e), alors que l'embryon n°2 (Pl. XIII, d) montraient plusieurs anomalies : aplatissement dorsal de la tête (tubercules bijumeaux déprimés), ouverture de l'oeil rétrécie, bec très court et membres postérieurs atrophiés (phocomélie).

Embryon MM(g) n°4

(récupéré le 15^e jour ; mort la nuit précédente).

Le stade présenté par cet embryon (38 HH) est atteint normalement à 12 jours d'incubation chez le Poulet et à 15-16 jours chez le Dindon. Sa taille était voisine de celle du Poulet, mais aucun appendice céphalique caractéristique n'était visible. Son duvet, encore rare, était en majeure partie blanc, mais avec quelques bourgeons plumaires (*prae-pennae*) rouge brun localisés de part et d'autre de la ligne médio-dorsale et sur les cuisses (*Pl. XIII, f*). Ce caractère pigmentaire paraît complètement étranger au génome des gamètes impliqués, provenant de dindons PBB de race blanche. Il rappelle au contraire le plumage rouge brun de la poule expérimentée / M(g) / qui a hébergé et nourri les ovocytes de dinde.

Quelques bourgeons plumaires rouge brun ont été prélevés chez ce sujet afin d'être comparés à ceux d'un dindon blanc (PBB) et à ceux d'un poulet rouge brun (RW o) de même stade (38 HH). Leur forme générale, présentant notamment une pointe très effilée, et le rapport de leur diamètre moyen sur leur longueur ($\frac{D}{L} = 0,027$) permettent de les identifier aux bourgeons plumaires du dindon, car ceux du poulet ont une pointe plus courte et un rapport $\frac{D}{L}$ inférieur (0,020). Ils sont toutefois semblables à ces derniers par la taille et par le fait que leur partie moyenne renferme de nombreux granules pigmentaires rouge brun et noirs (*Fig. 7*). On retrouve donc dans ce cas tous les caractères morphologiques des embryons de Dindon, à l'exception de la taille et du pigment.

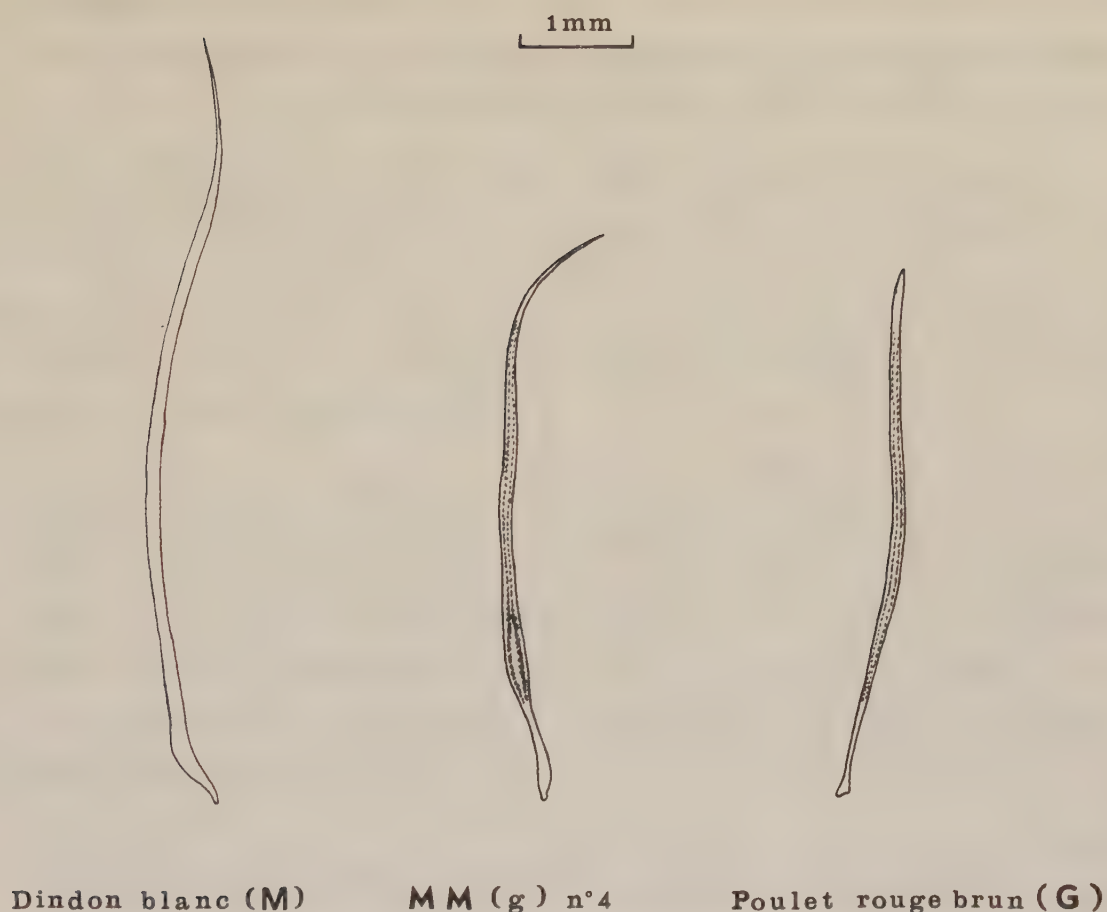


Fig. 7 - Schéma des bourgeons plumaires (praepectennae) au stade 38 HH

Comparaison avec l'accouplement normal du dindon et de la dinde

Les résultats de ce croisement [M x M(g)] sont meilleurs et plus facilement explicables que ceux du croisement réciproque [M(g) x M].

En premier lieu, la technique d'insémination artificielle a fonctionné correctement. En effet, les spermatozoïdes de Dindon introduits dans les voies génitales de la poule M(g) se sont montrés capables, à plusieurs reprises, de féconder ses ovocytes et d'assurer la progression du développement embryonnaire jusqu'à un stade avancé (38 HH). Il est exclu que les

embryons obtenus (6 sur 36 oeufs, soit 17 %) soient d'origine parthénogénétique puisqu'on n'en rencontre jamais plus de 1 % chez les oeufs vierges de dindes normales (OLSEN et MARSDEN, 1956).

Le fait que les oeufs n'aient jamais plus été fécondés à la suite de la 5^e insémination, faite 18 jours après la 1^{ère}, semble indiquer l'intervention d'une réaction sérologique. On sait en effet que les spermatozoïdes de Dindon, qui sont agglutinés *in vitro* par le plasma de Poulet, possèdent certains des antigènes spécifiques que l'on trouve dans les erythrocytes (RYLE, 1957). A la suite d'inséminations répétées, des anticorps anti-Dindon, fabriqués par la poule et passés dans la lumière de son oviducte, pourraient donc agglutiner ou altérer les spermatozoïdes de Dindon. Cela est en accord avec les observations de POOLE et OLSEN (1967) qui, à la suite d'inséminations hebdomadaires de dindes avec du sperme de coqs, ont constaté que la fécondation des oeufs, assez fréquente au début, ne s'observait plus au-delà de la 3^e semaine. Le même résultat peut d'ailleurs être atteint par des injections intrapéritonéales de sperme de coq quelques semaines avant l'insémination (POOLE et OLSEN, 1967). La poule M(g), qui a reçu pendant la vie embryonnaire une injection intraveineuse de cellules de Dindon et qui a hébergé les gonocytes de cette espèce, n'aurait donc pas acquis pour autant une tolérance immunitaire complète envers elle, à l'inverse de ce qui se passe à la suite d'une parabiose embryonnaire entre Poulet et Dindon (HRABA, 1956).

Il faut souligner cependant que l'introduction de Locke au cours des opérations de transfert de CGP pourrait être également responsable de la perte de la fécondité des oeufs ainsi que de certaines anomalies embryonnaires observées dans la descendance de la poule injectée (cf. discussion et chapitre IV). En ce qui concerne les embryons d'aspect normal, leur mortalité tardive (après 8-10 jours d'incubation) pourrait être due à une incompatibilité physiologique entre l'embryon MM(g) de génotype *Meleagris* et ses enveloppes ovulaires (albumen nourricier notamment) de type *Gallus*.

3) DISCUSSION

Comme l'avaient déjà montré les études préliminaires (Chapitres I et II), des CGP de Dindon, injectées à des embryons de Poulet préalablement stérilisés, ont pu se fixer dans leurs ébauches gonadiques, proliférer et se transformer en gonies. De plus, chez 3 sujets expérimentés qui ont éclos et qui ont été élevés jusqu'à la maturité sexuelle, *ces gonies ont été capables de subir le processus complet de gamétogenèse correspondant au sexe de l'hôte puisque des spermatozoïdes et des oeufs aptes à la fécondation ont été obtenus.*

Cependant, on a constaté que les mâles injectés ont produit sans interruption des gamètes apparemment conformes à leur origine spécifique tandis que la femelle traitée n'a pondu que pendant une courte période des oeufs portant parfois des traces d'altération. Il faut donc tenter d'analyser les causes de cette différence avant de passer en revue les facteurs susceptibles de limiter la fécondité des sujets expérimentés au cours des divers croisements.

a) Causes possibles de l'arrêt de la production des gamètes

Alors que des spermatozoïdes ont été produits pendant plus de 2 ans par les coqs expérimentés, la poule M(g) n'a pondu que durant 7 mois (133 oeufs au total). Cet arrêt de ponte ne pouvant pas être attribué à des facteurs hormonaux puisque des injections d'oestrogènes ont été faites sans succès, il faut chercher ailleurs la cause du blocage des ovocytes dans l'ovaire. Deux facteurs sont *a priori* susceptibles d'intervenir dont l'un est intrinsèque et l'autre extrinsèque.

Facteur intrinsèque

Dans la suspension cellulaire injectée aux embryons de Poulet, qui a été obtenue par la dissociation de 5 croissants germinaux (cf. Chapitre I, B), il ne fait aucun doute que des cellules germinales génétiquement mâles (de constitution chromosomique ZZ) et femelles (ZW) se trouvent

généralement mêlées. Par suite, une partie seulement des gonocytes transférés seront de même sexe génétique que l'hôte. Or, l'étude histologique des gonades a montré que les cellules germinales introduites se multiplient activement et parviennent à rétablir une population cellulaire normale en 3 jours de délai environ (Chapitre II, B). De plus, aucun phénomène de dégénérescence n'ayant été constaté durant cette période, on doit admettre que des gonocytes de sexe opposé à celui de l'hôte peuvent subsister sans dommage et même participer au phénomène de régulation, en dépit de la différenciation sexuelle qui s'instaure et qui est imposée par le soma gonadique environnant. Plus tard, il est vraisemblable que les gonocytes de sexe conforme à celui de l'hôte subissent sans difficulté les diverses phases de la gamétogenèse correspondant au sexe, mais on peut se demander ce qu'il advient des gonocytes de sexe opposé.

En ce qui concerne l'évolution de cellules germinales femelles (ZW) dans un testicule, les expériences d'ablation de l'ovaire gauche, juste après l'éclosion, ont prouvé que les gonocytes ZW, contenus dans la gonade droite qui se transforme en testicule, sont parfaitement capables de donner naissance à des spermatozoïdes (BENOIT, 1923, 1932). Il doit en être de même chez les mâles injectés et cette faculté rend compte, vraisemblablement, de la production élevée et constante de gamètes par les deux coqs expérimentés. Pour ce qui est de la destinée de gonocytes mâles (ZZ) introduits dans un ovaire, des expériences de greffe réalisées par HAFFEN (1969) ont montré que leur maturation complète est impossible, du moins chez le Poulet, les ovocytes ZZ dégénéralent brutalement pendant la prophase préméiotique. Ce phénomène a pu intervenir chez la poule M(g) mais il paraît exclu qu'il soit responsable de son arrêt de ponte puisque son ovaire contenait plusieurs ovocytes ayant largement dépassé ce stade (*Pl. XII : e, f*).

Facteur extrinsèque

On a dit plus haut que l'insémination répétée de la poule M(g) avec du sperme de Dindon pouvait développer sa production d'anticorps

anti-Dindon au point de lui faire agglutiner tous les spermatozoïdes de cette espèce au bout de 3 semaines. Il est possible que ces anticorps circulants aient réagi ensuite au niveau de la membrane des ovocytes de dinde, porteuse d'antigènes jusque là "tolérés" par la poule, en altérant sa perméabilité. Par suite, les matériaux vitellins exogènes ne pourraient plus pénétrer dans l'oeuf dont la croissance serait stoppée. Cette hypothèse paraît confirmée par le fait que les ovocytes trouvés dans l'ovaire de M(g) sont tous bloqués au même stade (8 mm) correspondant au début de la phase finale d'accumulation des matériaux vitellins exogènes.

b) Causes possibles de la modification des gamètes

Autant qu'on a pu en juger par l'examen microscopique, les spermatozoïdes des coqs M(g) n'ont pas été modifiés dans leur structure par rapport à ceux des dindons normaux (M). Cela n'exclut pas, bien entendu, que des modifications se soient produites aux niveaux ultrastructural et moléculaire, sous l'influence de matériaux d'origine somatique incorporés notamment par les spermatides en cours de croissance.

En ce qui concerne les oeufs de la poule M(g), une altération s'est manifestée sous forme de marbrures du jaune. Celles-ci traduisent vraisemblablement une perturbation du métabolisme ovulaire sous l'effet de la pénétration intense de diverses substances maternelles (ARN, protéines, lipides) au cours de la phase terminale de la vitellogenèse. Si cette explication est correcte, l'altération des oeufs doit être générale, bien que les marbrures ne soient pas toujours apparentes. De plus, elle est peut être accompagnée d'autres modifications qui passent constamment inaperçues, à l'observation directe ou macroscopique.

c) Facteurs limitant la fécondité des sujets expérimentés

Deux tableaux ont été dressés afin de récapituler les résultats des différents croisements du point de vue quantitatif (*Tableau 8*) et qualitatif (*Tableau 9*). A leur lecture, on s'aperçoit que certains facteurs peuvent abaisser les pourcentages de fécondations alors que d'autres n'interviennent que plus tardivement, en bloquant ou en altérant le développement embryonnaire.

Facteurs pouvant abaisser les pourcentages de fécondations

L'absence ou la suppression de la fécondation n'est problématique que dans les cas où les deux gamètes en présence possèdent le même génome, c'est-à-dire lorsque l'insémination artificielle a été utilisée (*Tableau 8, A*). En effet, dans les cas opposés, correspondant aux accouplements, les facteurs qui empêchent normalement la fécondation croisée (c'est-à-dire la pénétration du spermatozoïde étranger et l'amphimixie) doivent intervenir comme dans l'hybridation interspécifique correspondante. En fait, le taux de fécondation enregistré à la suite de ces accouplements est identique sinon supérieur à celui obtenu par l'hybridation (*Tableau 8, N*).

L'absence de fécondation qui a été notée lorsqu'une dinde normale a reçu du sperme de coq expérimenté (*Tableau 9, 5*) pourrait être due, comme on l'a dit plus haut, à une *modification du système acrosomial* ou à un *défaut de capacitation des spermatozoïdes de Dindon* enrobés dans du liquide séminal de Poulet. L'hybridation entre coq et dinde produisant toutefois 20 % d'oeufs fécondés, on doit aussi considérer la possibilité d'un *échec de la technique d'insémination* elle-même.

Lors du croisement entre un dindon normal et la poule expérimentée (*Tableau 9, 3*), la fécondation n'a été supprimée qu'après plusieurs inséminations et on a sans doute affaire à une *réaction sérologique de la poule aux antigènes liés aux spermatozoïdes de Dindon*. Cette réaction paraît aussi capable de bloquer ultérieurement la croissance des ovocytes dans l'ovaire (*Tableau 9, 2*).

	Nombre d'oeufs examinés	Oeufs fécondés		Embryons	
		Nombre	%	Nombre	%/oeufs fécondés
(N) Accouplement naturel (individus de même soma)	Coq expérimenté n°1 x Poule normale	46	76	28 (13 anormaux)	63,5
	Coq expérimenté n°2 x Poule normale	30	77	17 (10 anormaux)	56,5
	Coq normal x Poule expérimentée	6	21,5	0	0
(A) Croisement par insémination artificielle (individus de même germe)	Coq expérimenté n°1 x Dinde normale	2(?)	13(?)	0	0
	Coq expérimenté n°2 x Dinde normale	3(?)	18,5(?)	0	0
	Dindon normal x Poule expérimentée	11	30,5	6 (2 anormaux)	54,5

N.B. : le (?) signifie que l'on ne sait pas si on a affaire à une fécondation ou à un développement parthénogénétique.

Tableau 8 - Résultats quantitatifs des divers croisements réalisés avec les sujets expérimentés.

Facteurs pouvant bloquer le développement embryonnaire

Lorsqu'il y a eu fécondation, le blocage du développement intervient plus ou moins rapidement selon la constitution du zygote.

Quand le noyau du zygote est hybride alors que son cytoplasme (et tout son vitellus) est de type *Gallus* pur (Tableau 9, 4), la létalité embryonnaire se manifeste exactement comme dans l'hybridation correspondante (dindon x poule). Dans le cas où, en plus du caractère hybride du noyau, on a un cytoplasme d'origine *Meleagris* qui a reçu des substances maternelles de type *Gallus* (Tableau 9, 1), la létalité est anticipée par rapport à l'hybridation correspondante (coq x dinde). Enfin, le rôle joué par ces transferts de substances dans le déterminisme de la létalité embryonnaire paraît confirmé par les résultats du croisement entre un dindon normal et la poule expérimentée (Tableau 9, 3). En effet, bien que le noyau des zygotes renferme exclusivement des chromosomes de *Meleagris*, tous les embryons constitués meurent à plus ou moins brève échéance. La mortalité précoce pourrait être due, comme dans le cas précédent, à l'altération du cytoplasme sous l'influence des substances maternelles étrangères. La létalité plus tardive pourrait résulter d'une malnutrition de l'embryon par des réserves extra-cellulaires étrangères en partie (pour le vitellus) ou en totalité (pour l'albume).

Il faut signaler enfin qu'un facteur génétique est théoriquement capable de bloquer rapidement le développement d'un petit nombre des descendants des coqs expérimentés. En effet, si certains de leurs spermatozoïdes peuvent provenir, comme on l'a indiqué plus haut, de spermatogonies ZW, la moitié d'entre eux hériteront du chromosome W. Par suite, leur fusion avec un ovocyte de constitution W (dans 50 % des cas) produira un mutant WW, létal par délétion.

Causes des anomalies embryonnaires et des modifications phénotypiques

A la suite des croisements entre coqs expérimentés et poules normales, on a observé de nombreuses anomalies embryonnaires (plus de 50 %,

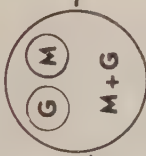
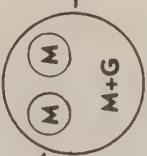
♂ Sperme	Type d'insémination	♀ Ovocyte	Oeuf avant l'amphiximie	Embryon (développement maximum)	Remarques
Coq normal 	nat.	1  Poule	1 		-aggravation par rapport à l'hybridation $G \times M$
Dindon normal 					
	art.	2  Poule exp.tée	2 		-réaction sérologique après plusieurs inséminations ↓ suppression de la fécondation -incompatibilité embryon-oeuf? Quelques <u>prae pennae</u> rouge brun rappelant le phénotype maternel (G)
Coq exp.té 					
G = Gallus M = Meleagris	nat.	3  Poule normale	3 		-identité par rapport à l'hybridation $M \times G$
	art.	4  Dinde normale	4 		-échec technique? -Défaut de capacitation ou de réaction acrosomiale? -Parthénogenèse possible

Tableau 9 - Résultats qualitatifs des divers croisements.

cf. *Tableau 8*) qui ne peuvent malheureusement pas être comparées à celles survenant dans l'hybridation correspondante (dindon x poule), puisque celles-ci n'ont jamais été décrites. Dans l'hybridation réciproque (coq x dinde), plusieurs auteurs (QUINN, BURROWS et BYERLY, 1937 ; ASMUNDSON et LORENZ, 1957 ; OLSEN, 1960) ont noté l'apparition de malformations diverses telles que loxie, colobome, microphthalmie, polydactylie, .. etc, mais qui affectaient des embryons plus évolués que ceux que j'ai obtenus.

Au cours du croisement entre un dindon normal et la poule M(g), 2 embryons malformés ont été trouvés. Bien qu'une action du cytoplasme ou des matériaux de réserves étrangers au génotype de l'embryon ne soit pas exclue, il est également possible, comme on l'a dit plus haut, d'incriminer la solution saline (Locke) quia servi à injecter les gonocytes primordiaux. En effet, MARTINOVITCH *et al.* (1962), qui ont pratiqué des injections de Tyrode dans le sang d'embryon de Poulet de 4 à 12 jours d'incubation, ont constaté l'apparition de nombreuses malformations embryonnaires (chondrodystrophie avec croissance retardée, bec de perroquet et pattes atrophiées) dans les première et deuxième générations issues des sujets femelles injectées. D'après les auteurs, ce résultat s'expliquerait par une lésion plus ou moins généralisée de l'ovaire, pouvant également s'exprimer par la perte de la fécondité des oeufs et même par la raréfaction de la ponte (cf. Chapitre IV, p.117).

En ce qui concerne la microembryonie, rencontrée chez plusieurs descendants des coqs expérimentés, il faut préciser qu'elle a été signalée aussi à la suite des hybridations interspécifiques (WARREN et SCOTT, 1935) et que, d'après RYLE (1957), elle pourrait résulter d'une réaction sérologique. En effet, les travaux d'EBERT (1950) ont montré que des sérums anti-organes de Poulet pouvaient, à une certaine dilution, permettre la différenciation mais empêcher la croissance de blastodermes de Poulet cultivés *in vitro*.

Enfin, pour ce qui est des modifications du phénotype embryonnaire, j'ai observé seulement l'apparition d'une pigmentation totalement

étrangère au génotype chez un embryon homozygote. Je me bornerai ici à souligner que cette pigmentation ne peut avoir été transmise ou induite que par des substances provenant du soma maternel, porteur dudit caractère pigmentaire, l'examen des modalités de son transfert devant faire l'objet du prochain chapitre.

RESUME

3 Poulets (2 mâles, 1 femelle) qui ont reçu, durant la vie embryonnaire et après avoir été stérilisés, une injection de CGP de Dindon ont pu être élevés jusqu'à la maturité sexuelle.

1. Les coqs M(g) ont produit sans interruption des spermatozoïdes apparemment identiques à ceux du Dindon, alors que la Poule M(g) n'a pondu que pendant 7 mois des oeufs dont le jaune montrait parfois des signes d'altération.

2. Ces 3 sujets ont été accouplés d'abord à des partenaires normaux de même soma (*Gallus domesticus* de même origine que les hôtes).

L'accouplement entre coq expérimenté et poule normale [M(g) x G] donne un résultat supérieur à l'hybridation entre dindon et poule (M x G) en ce qui concerne le pourcentage de fécondations (75 %), mais équivalent quant au développement embryonnaire qui ne dépasse jamais le stade 26 HH. Les embryons obtenus sont très souvent anormaux.

L'accouplement entre coq normal et poule expérimentée [G x M(g)] fournit un résultat équivalent à l'hybridation entre coq et dinde (G x M) en ce qui concerne le pourcentage de fécondations (20 %), mais très inférieur quant au développement qui n'aboutit qu'à la formation de membranes.

3. Les sujets expérimentés ont été croisés ensuite, par insémination artificielle, avec des partenaires normaux de même germe (*Meleagris gallopavo* de même race que les donneurs).

Dans le croisement entre coq expérimenté et dinde normale [M(g) x M], la fécondation ne s'est apparemment pas réalisée, ce qui pourrait être dû à l'absence de spermatozoïdes (échec technique) ou à l'altération de leurs propriétés (capacitation ou réaction acrosomiale) par le soma du coq.

Dans le croisement entre dindon normal et poule expérimentée [M x M(g)] la progéniture n'a pu atteindre dans le meilleur cas que le 15^e jour d'incubation (stade 38 HH). On pourrait attribuer la létalité embryonnaire au fait que les ovocytes de dinde transférés ont été modifiés par le soma de la poule, ce qui paraît confirmé, chez un rejeton, par le dépôt local d'un pigment plumaire étranger à son génotype. Cependant, les résultats sont aggravés ici par plusieurs facteurs extrinsèques qui peuvent empêcher la fécondation (réaction sérologique de la poule au sperme de dindon), ou limiter la survie embryonnaire (développement de l'embryon dans des enveloppes et avec des réserves étrangères), ou encore produire simultanément ces deux effets (action tardive sur l'ovaire du Locke injecté dans le sang).

CHAPITRE IV

TRANSFERTS INTRASPECIFIQUES DE CGP. POUVOIR REPRODUCTEUR ET DESCENDANCE (F_1) DE POULETS PORTEURS D'UN GERME DE RACE DIFFÉRENTE

Les Poulets porteurs d'un germe de Dindon n'ayant pas eu de progéniture viable, j'ai entrepris en dernier lieu une série de transferts intraspécifiques de CGP entre embryons de Poulet de races différentes. Les deux souches sélectionnées [Wyandotte blanche- M_{11} (W) et Rhode Island Red- M_{44} (R)] utilisées au départ paraissaient intéressantes parce qu'elles diffèrent à la fois par la crête, rosacée chez l'une, simple chez l'autre et par le plumage, blanc chez l'une, rouge brun chez l'autre (cf. sigles et nomenclature). Par suite, une modification éventuelle de la pigmentation plumaire, analogue à celle observée lors des transferts interspécifiques, serait tout aussi aisément décelable. De plus, je pensais qu'en éliminant totalement les échecs dus à l'insémination artificielle et aux différentes réactions d'incompatibilité entre espèces, je pourrais obtenir de nombreux descendants à partir des sujets expérimentés, ce qui permettrait d'analyser plus précisément les relations entre soma et germe.

Les techniques employées et les stades retenus pour les différentes opérations (irradiation, injection) ont été exactement les mêmes que dans les transferts interspécifiques.

A - PHÉNOTYPE ET CARACTÈRES SEXUELS DES SUJETS EXPÉRIMENTÉS

Dans un lot de 95 sujets injectés après avoir été stérilisés, 5 (soit 5,5 %) ont éclos dont 3 de race W qui avaient reçu des CGP de race R [R(w)] et 2 de race R qui avaient reçu des CGP de race W [W(r)].

Comme dans les transferts interspécifiques, *les opérations n'ont absolument pas altéré le phénotype des hôtes* : celui des 3 premiers poussins était parfaitement conforme à celui des témoins W (duvet néoptile blanc, crête rosacée) et celui des 2 autres au phénotype R (duvet rouge brun, crête simple).

Parmi les trois sujets R(w), un poussin (né le 7.05.72) est mort d'occlusion intestinale à l'âge de 11 jours. Sa dissection a montré qu'il était de sexe mâle et son étude histologique a révélé que ses testicules contenaient de très nombreuses spermatogonies. Sur les deux W(r), un sujet (né le 23.06.72) a développé des caractères sexuels secondaires mâles, mais il s'est avéré totalement stérile par suite d'un échec de la technique de transfert (cf. chapitre I et *Pl. IV : e, f*). Ainsi, des expériences de croisements n'ont pu être effectuées qu'avec le R(w) et les deux W(r) restants, tous trois de sexe femelle.

B - GAMETES, FECONDITE ET DESCENDANCE (F_1) DES SUJETS EXPERIMENTES

Les trois poules expérimentées n'ayant pas montré la même fécondité, on étudiera successivement chacune d'elles en commençant par la plus anormale.

1) Poule R(w) n°1

Cette femelle, de phénotype W (*Pl. XIV : a, b*) a éclos le 7.05.72 et pesait 39,5 grammes à la naissance. Elle a commencé à pondre à l'âge de 7 mois, le 9.12.72 .

Ses oeufs étaient d'aspect parfaitement normal et comportaient notamment un jaune de coloration uniforme et une cicatricule bien visible. Toutefois, cet animal n'a pondue que 29 oeufs en 3 mois (soit 1 oeuf tous les 3 jours environ), ce qui représente la moitié seulement de la fréquence

normale de ponte d'une poule de même âge. De plus, ces oeufs n'ont jamais produit d'embryons, bien que la poule ait été accouplée successivement avec 2 coqs normaux (W et R) qui l'ont coché normalement pendant plus d'un mois au total. Dans trois cas seulement, on a observé un léger élargissement du disque germinatif mais sans aucune formation d'îlots sanguins. Les coqs, en provenance directe du Magneraud (INRA), n'ayant subi aucun traitement et ne pouvant pas être suspectés de stérilité car ils ont fourni par ailleurs des descendants normaux, on doit admettre que ce sont les oeufs de la poule R(w) n°1 qui ne sont pas aptes à être fécondés, en dépit de leur aspect normal. D'après ce qui a été dit plus haut et d'après les résultats fournis par les autres poules expérimentées, il est apparu que cette stérilité et la raréfaction de la ponte qui l'accompagne ne peuvent être dues qu'à l'action pernicieuse du Locke injecté dans le sang sur l'ovaire de l'hôte.

2) Poule R(w) n°2

Cette seconde femelle de phénotype W (*Pl. XIV : c, d*) a éclos le 18.06.72 et pesait 36 grammes à la naissance. Elle a commencé à pondre le 5.01.73 à l'âge de 6 mois et demi.

a) Oeufs

Des oeufs, parfaitement normaux au début, ont été pondus par cette poule à la fréquence presque normale de 4 par semaine en moyenne (52 oeufs en 84 jours). Toutefois, aucun de ceux qui ont été produits à partir du 6.02.73 ne s'est développé, bien que la poule ait été accouplée à un coq W normal pendant 6 semaines. On assiste donc ici encore à une suppression de la fécondité qui est simplement retardée par rapport au cas précédent. En outre, depuis le 30.01.73, soit moins d'un mois après l'entrée en ponte, certains oeufs ont montré des caillots de sang (9 cas sur 34 oeufs pondus en deux mois) et de petits fragments d'ovaire (7 cas) accolés à la membrane vitelline ou libres dans l'albumen, ce qui ne s'observe que chez des femelles vieilles ou malades. Ces anomalies témoignent vraisemblablement

d'une dégénérescence de l'ovaire puisque, dans les conditions habituelles, la rupture de la paroi du follicule, au moment de l'ovulation, se fait au niveau du stigma, région dépourvue de vaisseaux et qui de ce fait ne saigne pas (PHILIPPS et WARREN, 1937).

b) Fécondité et descendance

La poule R(w) a été croisée avec un coq normal de même germen (R), puis avec un coq normal de même soma (W). Ces deux coqs, âgés de 9 mois, provenaient directement de l'INRA (Magneraud) ce qui constitue une garantie quant à leur origine (souches M₁₁ et M₄₄). Malheureusement, seul le premier croisement a été fécond tandis qu'au cours du second [W x R(w)], réalisé entre le 18.02 et le 31.03.73, la poule a pondu 25 oeufs qui n'ont montré aucun indice de développement.

La poule R(w) et le coq R ont été réunis le 11.01.73 et laissés ensemble pendant 10 jours, après quoi la femelle a été isolée. Durant la période d'appariement, au cours de laquelle de nombreux coïts ont été observés, 9 oeufs ont été recueillis. 11 autres, pondus au cours des deux semaines suivantes et susceptibles d'être fécondés par le sperme mis en réserve par la poule, ont été également conservés et mis à couver. Tous ces oeufs ont été contrôlés par mirage au 3^e jour d'incubation. Lorsque l'aire vasculaire n'était pas visible par transparence, l'oeuf était ouvert et examiné ; dans le cas contraire, il était laissé en couveuse et miré régulièrement tous les trois jours.

Les résultats concernant la fécondité et le développement de ces 20 oeufs sont regroupés dans le tableau ci-après :

Nombre d'oeufs pondus (du 11.01 au 6.02.73)	20				
Nombre d'oeufs stériles (entre la première et la dernière fécondation)	5				
Nombre d'oeufs fécondés	10				
Développements anormaux	<table> <tr> <td>Disque germinatif élargi ..</td><td>7</td></tr> <tr> <td>Embryons anormaux</td><td>1</td></tr> </table>	Disque germinatif élargi ..	7	Embryons anormaux	1
Disque germinatif élargi ..	7				
Embryons anormaux	1				
Embryons d'apparence normale morts avant l'éclosion	1				
Poussins éclos	1				

Tableau 10 - Résultats du croisement $R \times R(w)$

On peut remarquer en premier lieu que la proportion des oeufs stériles, même en faisant abstraction des 5 premiers, pondus au tout début de l'accouplement, est anormalement élevée (5 oeufs sur 15, soit 1/3 au lieu de 6 %). Les développements anormaux sont aussi très fréquents (8 cas sur 10). Dans 6 oeufs, on a observé un faible élargissement du disque germinatif - dont le diamètre reste cependant inférieur ou égal à 5 mm - tandis que dans le 7^e oeuf, il atteint 7 mm mais sans jamais montrer la moindre différenciation. La dernière anomalie consiste en un cas de microembryonnie affectant un sujet bloqué au stade 26 HH (5 jours d'incubation). Enfin, 2 individus seulement se sont développés normalement et ont dépassé le stade 39 HH (13 jours) qui permet de déterminer les deux principaux caractères phénotypiques (crête et pigmentation du duvet néoptile). L'un d'entre eux / $RR(w)$ n°5 / est mort deux jours avant l'éclosion (stade 44 HH) tandis que l'autre a éclos et est encore vivant actuellement.

Phénotype des sujets RR(w) qui ont franchi le stade 39 HH (13 jours)

RR(w) n°5

Au stade 44 HH où il est mort, cet individu de sexe mâle présentait une crête simple, conforme au phénotype R. Son duvet néoptile était rouge brun foncé sur presque toute la surface du corps, à l'exception de la partie antérieure des ailes et de toute la région ventrale qui portaient des *praepennae* blanc jaunâtre (Pl. XVI). Ce dernier caractère ne pouvant pas être considéré comme une modification puisqu'il est courant chez les poussins R normaux (LEROY, 1969), il apparaît que le phénotype de ce sujet est absolument conforme au génotype R (cf. sigles et nomenclature).

RR(w) n°6

Ce sujet de sexe femelle a éclos le 10.02.73 et son poids de naissance était de 35 grammes. Sa crête était simple. Il possédait un *fond de duvet jaune pâle, presque blanc*, à l'exception de la région dorsale du corps et de la base des ailes qui étaient rouge brun clair. Toutefois, il est apparu que l'extension du duvet jaune ne pouvait pas être considérée comme une modification spécifique car elle a déjà été constatée chez quelques poussins R normaux (LEROY, communication personnelle). Il fallait donc étudier la poussée du plumage téléoptile (juvénile) afin de le comparer à celui des témoins R qui ne montre pas de variations individuelles. En outre, on l'a confronté aussi à celui des métis RW car, en cas d'échec de la destruction des gonocytes W de la poule, le croisement réalisé se ramènerait à ce métissage.

Les poussins RR(w), R et RW mâles et femelles ont donc été photographiés à la naissance puis tous les 15 jours jusqu'à l'âge de 1 mois et demi et enfin à l'âge de 2 mois et demi, lorsque la première mue juvénile est terminée (Pl. XVI). Chez RR(w) comme chez le témoin R, on a pu suivre

ainsi l'apparition et la migration en direction céphalo-caudale de nombreux granules pigmentaires rouge brun et de quelques granules noirs - plus abondants chez RR(w) - dans les rémiges puis dans les rectrices juvéniles. A l'âge de 4 semaines, des plumes rouge brun ont poussé non seulement sur le dos, qui était pigmenté à la naissance, mais aussi sur la face ventrale dont le duvet néoptile était jaune clair chez RR(w) et brun clair chez R. A 6 semaines, des plumes rouge brun ont enfin poussé sur leur tête, tranchant beaucoup plus nettement avec les *praepennae* claires de RR(w) qu'avec celles, plus sombres, de R. Au début de leur croissance, toutes ces plumes téléoptiles rouge brun étaient un peu plus claires chez RR(w) que chez le témoin R. Cependant, elles ont foncé par la suite, si bien qu'au terme de la première mue juvénile (2 mois et demi), *le phénotype de RR(w) était pratiquement identique à celui de R* avec seulement un peu plus de noir sur les rectrices.

D'un autre côté, on a pu constater que le phénotype de RR(w) n'avait rien de commun avec celui des métis RW dont la crête est toujours rosacée et dont le duvet néoptile comporte toujours des bandes médio-dorsales noires (sur fond brun chez la femelle, sur fond blanc chez le mâle). De même, à la fin de la première mue juvénile, les différences de pigmentation plumaire sont encore très prononcées entre RR(w) ♀ et RW ♀ (Pl. XVI^{bis}).

En conclusion, ce premier croisement prouve que *les ovocytes de la poule R(w) proviennent réellement des CGP transférées par injection (R)*. En ce qui concerne les deux caractères étudiés (crête et pigmentation plumaire, qui sont les seuls bien distincts entre les deux races) il paraît n'y avoir eu *aucune modification de leur déterminisme sous l'influence du soma maternel*. On a simplement constaté dans un cas un léger retard de l'apparition des pigments plumaires dans certaines régions du corps, mais ce phénomène est connu chez des individus R de race pure.

3) Poule W(r)

Cet animal, de phénotype R (Pl. XIV : e, f), a éclos le 18.06.72 et pesait 37 grammes à la naissance. Il a commencé à pondre le 18.12.72 à l'âge de 6 mois.

a) Oeufs

Des oeufs, parfaitement normaux au début, ont été pondus par W(r) à la fréquence normale d'un oeuf tous les deux jours en moyenne (70 en 3 mois et demi). Cependant, les oeufs produits après le 12.02.73, soit moins de 2 mois après les premiers, ne se sont pas développés, bien que l'appariement de la poule W(r) avec un coq R normal ait été maintenu pendant 6 semaines. En outre, depuis le 16.03.73, certains oeufs ont montré des filets de sang coagulé (3 cas sur 9 oeufs pondus en 15 jours) ou des petits fragments d'ovaire (4 cas) généralement accolés à la membrane vitelline. On assiste donc à un processus de détérioration ovarienne, en tous points comparable à celui observé chez R(w) n°2.

b) Fécondité et descendance

La poule W(r) a été croisée avec un coq normal de même germen (W) puis avec un coq normal de même soma (R), qui étaient les mêmes que ceux utilisés précédemment. Malheureusement, ici encore, seul le premier croisement a été fécond puisqu'au cours du second appariement [R x W(r)], réalisé entre le 18.02 et le 31.03.73, la poule a pondu 20 oeufs qui étaient tous stériles.

La poule W(r) et le coq R ont été réunis le 11.01.73 et maintenus ensemble pendant 10 jours, après quoi la poule a été isolée. 10 oeufs ont été recueillis durant la période d'accouplement. 10 autres, pondus dans les 2 semaines suivantes, susceptibles d'être fécondés par le sperme mis en réserve par la poule, ont été également conservés. Tous ont été mis à couver puis contrôlés par mirage comme précédemment.

Les résultats concernant la fécondité et la descendance de ce couple ont été réunis dans le tableau ci-après :

Nombre d'oeufs pondus (du 11.01 au 6.02.73)		20	
Nombre d'oeufs stériles (entre la première et la dernière fécondation)		3	
Nombre d'oeufs fécondés		13	
Développements anormaux ..	Disque germinatif élargi Disque germinatif élargi + îlots sanguins Embryons anormaux	1 1 1	3
Embryons d'aspect normal ..	Morts pendant la 1ère semaine Morts pendant la 2è semaine . Morts pendant la 3è semaine .	2 2 5	9
Poussins éclos			1

Tableau 11 - Résultats du croisement $W \times W(r)$

On peut remarquer d'abord que la proportion des oeufs stériles est trois fois supérieure à la valeur habituelle (3 cas sur 16, soit 18 % au lieu de 6 %), même si l'on fait abstraction de 3 oeufs pondus au tout début de la période d'accouplement et d'un 4è pondu 15 jours après l'isolement de la poule. Les développements anormaux sont assez fréquents (3 cas sur 13), mais un peu moins que dans la descendance de la poule précédente. Dans 2 oeufs, le disque germinatif a subi une simple croissance, avec ou sans différenciation d'îlots sanguins, tandis que dans le troisième un embryon s'est développé jusqu'au stade 18 HH (3 jours) mais en présentant une torsion et une excroissance dans le milieu du tronc. Par ailleurs, de nombreux embryons (9 sur 13), bien que d'aspect normal, sont morts en cours d'incubation et notamment entre les 18è et 19è jours (stades 43 - 44 HH) qui correspondent à une phase particulièrement critique du développement (BRONKHORST, 1933). Enfin, un poussin [WW(r) n°18] a pu

éclore le 28.02.73 après avoir été beaucoup aidé, mais il était exceptionnellement petit (28 grammes) et n'a survécu que pendant une semaine (Pl. XV).

Phénotype des sujets WW(r) qui ont franchi le stade 39 HH (13 jours)

Les 7 sujets qui ont franchi le stade 39 HH à partir duquel les deux caractères étudiés sont apparus, possédaient tous une crête rosacée conforme au génotype W. Comme dans le cas précédent, ce caractère n'a donc pas été influencé par le soma R qui a hébergé et nourri les ovocytes W.

Au contraire, en ce qui concerne le plumage, aucun des 7 individus ne présentaient le duvet néoptile uniformément blanc (dépourvu de tout pigment) caractéristique de la race W et déterminé par un gène récessif (c). Ils possédaient tous des bandes (stripes) de *praepennae* noires sur un fond de duvet blanc ou rouge brun (Tableau 12).

Sujets WW(r) n°	Stade HH	Sexe	Phénotype (Plumage néoptile)
8	40	♂	Fond de duvet blanc avec bandes noires
10	44	♀	- id -
12	43	♀	- id -
16	44	♂	- id - (noir plus étendu sur la tête)
18	45 (éclos, mort à 1 semaine)	♀	- id -
19	44	♂	Blanc avec une petite tache noire sur le cou
14	42	♀	Fond de duvet rouge brun avec bandes noires

Tableau 12 - Phénotype des sujets WW(r) qui ont franchi le stade 39 HH

4 sujets WW(r) (n°8, 10, 12 et 16) montraient un fond de duvet blanc avec des bandes noires localisées dans la région médio-dorsale, à l'extrémité des ailes, ainsi que sur le dessus et les côtés de la tête. Le poussin qui a éclos (n°18) présentait le même phénotype. Il a été photographié à la naissance et à l'âge d'une semaine, juste après sa mort, afin d'être comparé aux poussins W normaux et aux métis WR mâles et femelles de même âge. Alors qu'ils étaient très différents des poussins W - qui ont théoriquement le même génotype qu'eux - ces 5 sujets WW(r) ressemblaient d'assez près aux métis WR qui possèdent comme eux des bandes de *praepennae* sombres (Pl. XV). Toutefois, quel que soit leur sexe, leur duvet se rapprochait davantage de celui des métis WR femelles, dont les bandes sont noires, que de celui des mâles où elles sont gris chiné.

Au contraire, les 2 derniers sujets (n°19 et 14) présentaient un phénotype nettement différent de celui des métis. Le duvet de WW(r) était presque entièrement blanc, ce qui le faisait ressembler aux poussins W, mais il comportait une tache noire dans la région du cou, ce qui ne peut pas se produire chez des individus W, homozygotes pour l'allèle *c* déterminant l'absence de pigments. Enfin, le spécimen n°14 montrait des bandes de *praepennae* noires analogues à celles des 5 sujets ci-dessus, mais sur un fond de duvet rouge brun couvrant presque tout le corps, ce qui est inconnu à la fois chez des poussins W et chez les métis WR des deux sexes (Pl. XV). En effet, le gène *s* qui conditionne la synthèse du pigment rouge brun (phéomélanine) chez les sujets R est récessif par rapport à l'allèle *S* déterminant l'absence totale de rouge brun chez les sujets W. Etant donné que ce gène est lié au sexe (porté par l'hétérochromosome Z), il peut se manifester chez les métis femelles RW qui ne reçoivent pas l'allèle *S* de leur mère (Pl. XVI). Par contre, il ne peut s'exprimer chez aucun des métis WR qui héritent tous du *S* de leur père. Il semble donc exclu que la poule W(r) ait été mal stérilisée et produise des oeufs conformes à son soma R.

En conclusion, il apparaît d'une part que les oeufs de la poule W(r)

proviennent effectivement des CGP transférées (W) et, d'autre part, que les caractères pigmentaires des poussins WW(r) issus de ses oeufs ont été modifiés par rapport aux poussins W normaux. On se retrouve en présence du même phénomène que celui déjà observé lors des transferts interspécifiques de CGP, chez un sujet MM(g). Dans un cas comme dans l'autre, la pigmentation, qui n'est pas conforme au génotype de l'oeuf fécondé, rappelle celle qui existe dans la race de la femelle expérimentée.

C - DISCUSSION

a) La pigmentation du plumage est déterminée par deux catégories de mélanines (eumélanine, phéomélanine) dont la synthèse est sous le contrôle du génome. Chez la Rhode Island Red, on connaît ainsi 5 gènes principaux (*i*, *e*, *C*, *s*, *b*) qui conditionnent la présence et la répartition des mélanines. Chez la Wyandotte blanche, on trouve des gènes correspondants (*i*, *e*⁺, *c*, *S*, *b*) dont un (*S*) s'oppose à la synthèse des phéomélanines et un autre (*c*) à celle de tout pigment. On pourrait donc supposer, pour expliquer l'apparition de pigments rouge brun et noir dans le plumage des poussins WW(r) que le génome a été modifié, c'est-à-dire qu'il y a eu une véritable mutation. Cependant, il faudrait non seulement avoir constaté le maintien des pigments dans le plumage téléoptile de ces sujets, mais encore avoir assisté à leur transmission régulière aux générations suivantes pour vérifier cette hypothèse.

b) Les deux pigments apparus chez WW(r) étant présents dans la race R, il paraît logique de supposer que des substances transférées du soma maternel à l'ovocyte ont permis leur synthèse. On peut dès lors mettre en cause soit les matériaux vitellogènes amenés à l'ovaire par le sang, soit

les matériaux élaborés par les cellules folliculeuses. La comparaison des présentes expériences, où la totalité du soma maternel - y compris le soma ovarien - est de spécificité différente, avec les greffes d'ovaire, où les cellules folliculeuses sont conformes aux ovocytes, paraît révéler un rôle déterminant des substances transportées par le sang. En effet, certains résultats des expériences de greffe rejoignent apparemment ceux que j'ai obtenus. GUTHRIE (1908), après avoir transféré un ovaire de Leghorn blanche à une Leghorn noire ovariectomisée qu'il a croisée ensuite avec un coq Leghorn blanc (de même germen), a noté l'apparition à la F₁ de poussins blancs portant des taches noires sur le dos. Ces poussins ressemblant aux métis (Leghorn blanc x Leghorn noire) de sexe femelle, DAVENPORT (1911), qui a renouvelé ces opérations avec d'autres races de poules, a prétendu que la greffe d'ovaire "blanc" n'avait pas pris et que c'était l'ovaire "noir", mal extirpé, qui avait régénéré et fourni les oeufs "noirs", fécondés par du sperme "blanc". Cela paraît peu vraisemblable car l'ovaire, lorsqu'il est excisé largement mais de manière incomplète, régénère en donnant un testicule ou, au mieux, un ovotestis rarement fonctionnel (TABER, 1964 ; GILBERT et WOOD-GUSH, 1970). PAVLOV (1951) qui a reproduit ces greffes chez les Leghorn blanches et noires, a également obtenu en F₁ des poussins blancs avec des plumes parfois terminées par des barbules noires. L'auteur, qui avait pris soin de marquer les ovaires transplantés à l'aide d'une suture de fil de soie colorée a pu constater, lors de l'autopsie des femelles reproductrices, que les ovaires fonctionnels n'étaient pas des ovaires régénérés, mais bien les ovaires greffés.

Une influence exercée sur le germen par des substances véhiculées par le sang est concevable dans le sexe femelle. En effet, pendant la phase terminale de la vitellogenèse, les cellules folliculeuses de la poule ne sont plus jointives et peuvent ainsi livrer passage aux matières premières abondantes et diverses synthétisées notamment dans le foie (WYBURN, JOHNSTON et AITKEN, 1966). La possibilité d'une action directe paraît enfin confirmée par le fait qu'on a pu obtenir, à de nombreuses reprises, en injectant systématiquement du sang étranger à des poussins ou à des volailles adultes, des modifications de la pigmentation plumaire dès la

F₁ (revue complète de la bibliographie dans LEROY, 1963, 1969).

c) On sait que les pigments mélaniques proviennent de la dégradation de certaines substances par des enzymes respiratoires. Il est donc naturel de penser que l'accumulation des mélanines chez l'embryon et le jeune poussin pourrait être liée à l'utilisation des réserves vitellines.

Comme celles-ci sont en grande partie d'origine maternelle, on pourrait ainsi expliquer que des oeufs WW(r) engendrent des poussins à *praepennae* noires ou rouges. Cette hypothèse semble s'accorder avec les résultats des expériences de greffe ovarienne interr raciale réalisées chez les Cobayes (CASTLE et PHILIPPS, 1913) et les Surmulots (WIESNER, 1923). Chez ces espèces où le vitellus fait entièrement défaut, la pigmentation du pelage ne s'est jamais montrée influencée par le soma maternel. Cette hypothèse paraît encore renforcée par le fait que, chez un poussin RR(w), le duvet néoptile avait au départ une coloration claire, le pigment n'étant apparu que dans le plumage téléoptile. En apparence, seule la pigmentation embryonnaire serait donc altérée par le séjour de l'oeuf dans un soma étranger. Il faut cependant rappeler que certains poussins R normaux présentent aussi quelquefois un plumage néoptile clair et on ne sait pas quel phénomène entraîne ce retard de la mélanisation. Il faudrait pouvoir suivre les jeunes dans leur développement et les faire se reproduire pour apporter une conclusion définitive.

Il est également possible que l'organisme maternel transfère au cytoplasme de l'oeuf des molécules porteuses d'information et notamment de l'ADN extra-nucléaire dont la présence a été confirmée chez les Oiseaux (NASS et NASS, 1963). En effet, MARTINOVITCH et KANAZIR (travaux rapportés par BENOIT, 1970), après avoir injecté de l'ADN de Rhode Island Red à des embryons de race Leghorn blanche, ont observé dans leur progéniture "des individus dotés de plumes pigmentées de brun, de rouge et noir, rappelant les teintes existant dans la race Rhode Island". Toutefois, il faut souligner que dans mes expériences, le soma maternel étant maintenu dans les conditions naturelles, le plasma sanguin ne contient qu'un taux normal, c'est-à-dire relativement faible d'ADN. D'ailleurs,

il n'est pas sûr que dans les expériences d'injection, l'ADN ne soit pas rapidement dégradé et ne perde de ce fait l'information qu'il renferme.

d) On a souligné la fréquence inhabituelle de développements et d'embryons anormaux dans la descendance des 2 poules expérimentées et il est apparu que le Locke qui a servi à injecter les CGP pouvait en être rendu responsable. Comme on l'a dit plus haut (Chapitre III), MARTINOVITCH et *al.* (1962) ont également noté de nombreuses anomalies dans la F₁ et la F₂ issues de poules ayant reçu une injection intraveineuse de Tyrode pendant la vie embryonnaire et ils ont invoqué notamment l'action éventuelle de certains ions présents à l'état de traces ou d'impuretés dans les solutions salines. On sait en effet que le magnésium et d'autres cations peuvent produire *in vitro* des altérations de la structure macromoléculaire des acides nucléiques et même provoquer des ruptures chromosomiques. Selon MARTINOVITCH et *al.* (1962), ces ions libres, en pénétrant dans les cellules germinales, pourraient léser directement certains constituants cellulaires ou simplement perturber certains processus métaboliques de l'ovogenèse. En fait, il est très difficile d'interpréter ce phénomène et je me bornerai à souligner que ses effets sont souvent tardifs et s'accompagnent de lésions ovariennes.

RESUME

Trois poules qui avaient fait l'objet d'un transfert intraspécifique de CGP ont été élevées jusqu'à la maturité sexuelle. Ainsi, chez deux d'entre elles, des gonocytes primordiaux de Rhode Island Red ont accompli leur maturation dans un ovaire de Wyandotte blanche [R(w)]. Dans l'ovaire de la troisième, de race Rhode Island Red, ont mûri des ovocytes de Wyandotte blanche [W(r)].

1. Ces poules ont montré des capacités de ponte souvent inférieures à la normale. Un fort pourcentage de leurs oeufs n'ont pas fourni d'embryons ou ont développé diverses anomalies. Ces phénomènes peuvent être attribués à l'action nocive du Locke qui a servi à injecter les CGP et qui produit également des lésions ovariennes.

2. La poule R(w) n°1 a pondu des oeufs d'aspect normal, mais en nombre réduit et qui ne se sont jamais développés, bien qu'elle ait été accouplée à 2 coqs normaux W et R.

3. La poule R(w) n°2 a commencé par pondre des oeufs normaux mais ceux qu'elle a produits un mois plus tard ont montré parfois des traces de sang et des fragments d'ovaire.

De plus, son croisement avec un coq normal de même germen (R) n'a fourni que 2 sujets normaux pour 20 oeufs pondus. Le premier, mort deux jours avant l'éclosion, présentait un duvet néoptile de pigmentation rouge brun conforme à celle des témoins de même génotype (R). Le second, qui a éclos et qui est toujours vivant, montrait un duvet nettement plus pâle - presque blanc en certains endroits - mais qui a été remplacé par un plumage téléoptile juvénile conforme à celui des témoins. La crête était simple dans les deux cas, c'est-à-dire également conforme au génotype d'origine (R).

Le croisement de cette poule avec un coq de même soma (W) a été tenté mais n'a pas fourni de résultats car ses oeufs ne se sont jamais plus développés.

4. La poule W(r) a pondu des oeufs qui étaient normaux au départ mais, après 3 mois de ponte, elle en a fourni aussi plusieurs contenant des traces de sang et des fragments d'ovaire.

Son croisement avec un coq normal de même germen (W) a produit 9 sujets normaux (pour 20 oeufs pondus) dont 1 seul a éclos mais n'a survécu que durant une semaine. Dans tous les cas, la crête (rosacée) était conforme au génotype de W. Par contre, aucun d'eux ne présentait le duvet néoptile entièrement blanc caractéristique de cette race. 5 individus

possédaient un duvet blanc avec des bandes dorsales noires, copiant d'assez près celui des métis WR. Chez 2 autres sujets, il en était au contraire très différent, ce qui exclut la possibilité d'un authentique métissage qui se serait produit si la poule avait été mal stérilisée.

Le croisement de cette poule avec un coq normal de même soma (R) a été tenté mais n'a pas donné de descendance car, comme dans le cas précédent, ses oeufs ne se sont plus développés.

5. L'ensemble de ces expériences suggère que le séjour des ovocytes dans un soma d'une autre race peut entraîner des modifications dans la synthèse des pigments du plumage néoptile, alors que les caractères de la crête ne sont pas affectés. Le déterminisme et le mécanisme de ces altérations restent encore à élucider.

CONCLUSIONS GENERALES

Les recherches qui viennent d'être exposées apportent une contribution à l'étude des relations entre soma et germen chez le Poulet.

La technique que j'ai mise au point sur des embryons dans l'oeuf permet en effet de répondre de façon précise à certaines questions et d'apporter quelques éléments de réponse à d'autres.

L'irradiation aux rayons ultraviolets du croissant de SWIFT a permis d'obtenir à volonté des embryons totalement dépourvus de cellules germinales mais pouvant néanmoins se développer et atteindre parfois le stade de l'éclosion. Un coq adulte stérile a même été obtenu par ce procédé, ce qui constitue un résultat inédit. Il apporte la preuve définitive que les CGP sont la source unique des cellules sexuelles et que le soma gonadique - incapable d'engendrer des gonocytes - se différencie complètement en l'absence de germen.

L'injection de CGP de Dindon dans la circulation sanguine vitelline d'embryons de Poulet préalablement stérilisés a confirmé que les ébauches gonadiques de cette espèce étaient capables de fixer les gonocytes primordiaux d'une espèce étrangère.

Des expériences d'injection différée ont aussi montré que cette compétence disparaissait dès le début de la différenciation de l'ébauche somatique de la gonade. En outre, il est apparu que les gonocytes transférés dans un soma étranger étaient capables de proliférer activement pour restaurer une population germinale normale et de subir une maturation complète aboutissant à des gamètes généralement aptes à la fécondation.

Afin de déceler une influence éventuelle du soma sur le germen, j'ai

ensuite réalisé deux types de transferts de CGP, d'abord interspécifiques (de Dindon à Poulet), puis intraspécifiques (d'une race de Poulet à une autre) qui ont permis de disposer de 5 sujets expérimentés féconds.

Le premier type de transfert a révélé que les spermatozoïdes de dindon peuvent se différencier normalement dans le soma d'un coq. Certains sont même aptes à féconder des oeufs de poule qui produisent alors des embryons létaux tout-à-fait comparables à ceux que l'on obtient par l'hybridation correspondante.

Par contre, les ovocytes de dinde se sont montrés plus sensibles, sans doute en raison de l'importance du transfert des substances de réserve élaborées dans les cellules folliculeuses et dans d'autres organes maternels. Ainsi, le jaune a parfois montré un aspect anormal et la fécondation croisée a donné des résultats inférieurs à ceux de l'hybridation correspondante. De plus, un embryon issu de la fécondation de ces ovocytes par les spermatozoïdes d'un dindon normal a montré un duvet néoptile apparemment influencé par le soma maternel.

Malheureusement, dans ce type de transferts, diverses réactions d'incompatibilité entravent la ponte, la fécondation et le développement embryonnaire. Ainsi, la poule peut apparemment développer, après plusieurs inséminations avec du sperme de dindon, une réaction sérologique anti-dindon qui empêche toute fécondation ultérieure et qui semble pouvoir stopper ensuite la croissance terminale des ovocytes de dinde dans son ovaire. De plus, dans tous les cas où ces ovocytes ont pu être fécondés par des spermatozoïdes normaux de même espèce, le développement a quand même été bloqué tardivement sans doute à cause d'une incompatibilité entre l'embryon et ses réserves.

Au cours des transferts intraspécifiques, alors qu'on pouvait s'attendre à des pontes normales et à une progéniture nombreuse chez les poules expérimentées, on s'est trouvé confronté à de nouvelles anomalies vraisemblablement dues aux effets nocifs, sur les ovocytes, du Locke ayant servi à injecter les CGP. Ces effets expliquent peut être aussi une partie des échecs enregistrés lors des transferts interspécifiques.

En ce qui concerne les résultats, c'est-à-dire les phénotypes présentés par la progéniture issue des gonocytes transférés, on n'a pas pu pousser très loin leur analyse. En effet, les fécondations ont été peu nombreuses, les développements souvent anormaux et les sujets d'aspect normal sont presque tous morts quelque temps avant ou après l'éclosion. Néanmoins, il semble se dessiner les résultats suivants :

Des modifications du phénotype ont été observées dans la descendance (F1) issue des ovocytes hébergés et nourris par un soma étranger. Toutefois, elles n'ont jamais concerné des caractères morphologiques tels que la crête et elles ne sont pas toujours identiques d'un sujet à l'autre.

Ces modifications concernent toujours, comme dans les transferts interspécifiques de CGP, la pigmentation du duvet néoptile, ce qui fait qu'on n'est même pas assuré qu'elles persistent chez l'adulte. Tout porte à croire qu'elles sont déterminées par le soma maternel dont elles empruntent certains caractères ; mais on ne connaît pas les substances impliquées ni le mécanisme de leur intervention sur l'élaboration des pigments plumaires.

R E S U M E

1. L'irradiation aux rayons ultraviolets du croissant germinale d'embryons de Poulet aux stades 8⁺ à 10 HH (28 heures) provoque la destruction efficace et rapide des CGP. Il en résulte souvent une stérilité totale et définitive des gonades qui n'empêche ni leur organogenèse ni leur différenciation complète.

Cette opération n'est pas toujours compatible avec une survie prolongée de l'embryon par suite de la lésion des ébauches vasculaires et nerveuses localisées dans le territoire irradié.

2. Chez les embryons de Poulet stérilisés par irradiation qui ont pu atteindre le stade 19 HH (3 jours), l'injection dans une veinule vitelline de CGP de Dindon aboutit à leur fixation rapide dans les ébauches gonadiques stériles. Le Locke acalcique dans lequel les cellules sont dissociées et injectées n'entraîne dans l'immédiat que quelques accidents circulatoires. Cependant, il peut affecter, à long terme, les cellules somatiques de l'ovaire et les ovocytes qui ne sont plus fécondables ou qui engendrent des embryons anormaux.

3. La compétence des ébauches gonadiques de Poulet à fixer les CGP de Dindon circulant dans le sang se maintient jusqu'au 5^e jour d'incubation (stade 26 HH). Elle disparaît juste après, lorsque l'épithélium germinatif prolifère et commence à se différencier.

4. Les gonocytes primordiaux de Dindon, introduits en nombre réduit dans les ébauches gonadiques de Poulet, prolifèrent de façon accélérée de sorte qu'en 3 jours, leur nombre est le même que chez les Dindons témoins. Leur population évolue ensuite conformément à cette espèce, ce qui laisse supposer que les facteurs qui limitent son expansion lui sont intrinsèques et n'émanent pas des gonades.

5. Les gonocytes primordiaux de Dindon transférés à l'embryon de Poulet peuvent subir une maturation complète et fournir des gamètes plus ou moins aptes à la fécondation.

Les spermatozoïdes fécondent les oeufs de poule avec une fréquence plus grande que les spermatozoïdes normaux de Dindon, mais sans assurer un développement embryonnaire plus important ou plus normal. Cependant, on n'est pas parvenu à leur faire féconder des oeufs de dinde.

Les oeufs ont montré parfois un vitellus d'aspect anormal et n'ont été pondus que durant 7 mois. Mis en présence de spermatozoïdes de coq, ils ont été quelquefois fécondés (ou peut-être simplement activés), mais ils n'ont jamais fourni d'embryons. Fécondés par des spermatozoïdes de Dindon, ils ont fourni des embryons, parfois anormaux, qui ont atteint dans le meilleur cas le 15^e jour d'incubation (stade 38 HH). Certaines *praepennae* du sujet qui a atteint ce stade montraient une pigmentation rouge brun qui n'est pas déterminée, en temps normal, par le génotype du zygote (dindon de race blanche) et qui rappelle le phénotype de la mère nourricière (poule rouge brun).

6. A la suite de transferts intraspécifiques de CGP, on a pu obtenir la maturation d'ovocytes de Rhode Island Red à l'intérieur d'un ovaire de Wyandotte blanche (2 cas) et celle d'ovocytes de Wyandotte blanche dans un ovaire de Rhode Island Red (1 cas). La ponte a également été possible, mais à une fréquence souvent inférieure à la normale.

Lorsqu'une poule Wyandotte, portant des ovocytes de Rhode Island a été accouplée à un coq Rhode Island, le duvet néoptile des poussins s'est montré plus clair que celui des Rhode Island dans un cas, mais il a été remplacé par un plumage téléoptile conforme au génotype.

Lorsqu'une poule Rhode Island, portant des ovocytes de Wyandotte a été accouplée à un coq Wyandotte normal, le duvet néoptile n'a jamais été conforme au génotype. Il présentait toujours du pigment noir plus ou moins étendu, et dans un cas, du pigment rouge brun, qui sont tous deux présents chez la mère nourricière. On ne connaît ni l'origine ni le mécanisme de ce transfert de caractère pigmentaire qui ne constitue peut-être qu'un effet transitoire affectant le duvet des produits de la première génération. La crête, quant à elle, s'est montrée dans les deux cas conforme au génotype d'origine.

BIBLIOGRAPHIE

- ALTMAN (P.L) et DITTMER (D.S), Dir., 1962 - *Growth including reproduction and morphological development*. Washington, Feder. Amer. Soc. exp. Biol., in-4°, 608 pp.
- ANCEL (P), 1956 - Recherche sur les effets tératogènes de l'ouverture de l'oeuf de Poule au cours des trente-quatre premières heures de l'incubation. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 45, 203-217.
- ANDRES (G), 1953 - Experiments on the fate of dissociated embryonic cells (chick) disseminated by the vascular route. II. Teratomas. *J. Exp. Zool.*, 122, 507-540.
- ASMUNDSON (V.S) et LORENZ (F.W), 1957 - Hybrids of ring-necked pheasants, turkeys, and domestic fowl. *Poultry Sci.*, 36, 1323-1334.
- ASAYAMA (S), 1967 - Morphological and histochemical approaches to the problem of the origin of germ cells and the sex differentiation of gonads in Vertebrates. *Gunma Symp. Endocr.*, 4, 81-99.
- AUBRY (Régine), 1963 - Nouveaux essais de stérilisation totale des gonades de *Rana temporaria* par action des rayons ultraviolets sur le pôle inférieur de l'oeuf. *C.R. Ac. Sci.*, 236, 1101-1102.
- BELLAIRS (R), 1965 - The relationship between oöcyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, 13, 215-233.
- BELLAIRS (R), 1967 - Aspects of the development of yolk spheres in the hen's oöcyte, studied by electron microscopy. *J. Embryol. exp. Morph.*, 17, 267-281.
- BENOIT (J), 1923 - Sur la structure histologique d'un organe de nature testiculaire développé spontanément chez une Poule ovariectomisée. *C.R. Acad. Sci.*, 177, 1243-1246.
- BENOIT (J), 1930.a - Contribution à l'étude de la lignée germinale chez le Poulet. Destruction précoce des gonocytes primaires par les rayons ultraviolets. *C.R. Soc. Biol.*, 104, 1329-1331.
- BENOIT (J), 1930.b - Destruction des gonocytes primaires dans le blastoderme du Poulet par les rayons ultraviolets, aux premiers stades du développement embryonnaire. *Proc. 2nd Intern. Congr. for Sex Res.*, 162-170.
- BENOIT (J), 1932 - Etude physiologique, histologique et histophysiologique de l'inversion sexuelle de la poule déterminée par l'ablation de l'ovaire gauche. *Arch. Zool. exp. gen.*, 73, 1-112.
- BENOIT (J), 1970 - Modifications de caractères morphologiques par injection d'extraits riches en ADN chez le Canard Pékin. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 104, 239-339.
- BENOIT (J) et BRARD (E), 1968.a - Greffes testiculaires fertiles de poussins Wyandotte blanc insérées dans des testicules de coqs R.I.R. préalablement stérilisés par les rayons X. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 1308-1310.

- BENOIT (J) et BRARD (E), 1968.b - Greffes interraciales de testicules chez les Gallinacés. *Testotestes* fertiles obtenus par greffe de testicules de poussins Wyandotte blanc dans les testicules stérilisés par les rayons X de coqs R.I.R. *C.R. Soc. Biol.*, 162, 838-843.
- BERENBERG-GOSSLER (H) Von, 1914 - Ueber Herkunft und Wesen der sogenannten primären Urgeschlechtszellen der Amnioten. *Anat. Anz.*, 47, 241-264.
- BLACKLER (A.W) et FISCHBERG (M), 1961 - Transfer of primordial germ-cells in *Xenopus laevis*. *J.Embryol. exp. Morph.*, 9, 634-641.
- BLOCKER (H.W), 1933 - Embryonic history of the germ cells in *Passer domesticus* (L.). *Acta Zool.* 14, 111-162.
- BOUNOURE (L), 1937 - La constitution des glandes génitales chez la Grenouille rousse après destruction étendue de la lignée germinale par l'action des rayons U.V. *C.R. Acad. Sci.*, 204, 1957-1959.
- BOUNOURE (L), 1950 - Sur le développement sexuel des glandes génitales de la Grenouille en l'absence de gonocytes. *Arch. Anat. microsc. Morph. exp.*, 39, 247-256.
- BRACHET (J), 1965 - Le rôle des acides nucléiques dans la morphogenèse. *Ann. Biol.*, 4, 21-48.
- BRARD (E) et BENOIT (J), 1969 - Stérilisation de Cailles par les rayons X et greffes interraciales de gonades. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 103, 313-321.
- BRONKHORST (J.J), 1933 - A physical, chemical and physiological study of high and low hatching lines of single comb White Leghorn. *Thesis Cornell Univ., Ithaca, N.-Y.*
- BURDICK (M.L), 1968 - A test of the capacity of chick embryo cells to home after vascular dissemination. *J. exp. Zool.*, 167, 1-19.
- BURROWS (W.H) et QUINN (J.P), 1937 - The collection of spermatozoa from domestic fowl and turkey. *Poultry Sci.*, 16, 19-24.
- CASTLE (W.E) et PHILIPPS (J.C), 1913 - Further experiments on ovarian transplantation in guinea-pigs. *Science*, 38, 783-786.
- CHISHIMA (O), 1952 - Studies on the relationship between the histogenesis of the gonad and the differentiation of the blood cells in the chick embryo. *Sonder. Okajimas Fol. Anat. Jap.*, 24, n°3.
- CLAWSON (R.C) et DOMM (L), 1963 - Developmental changes in chick embryo. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 112, 533-537.
- CLAWSON (R.C) et DOMM (L.V), 1969 - Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo : a study of the stages definitive primitive streak through 8 somites. *Amer. J. Anat.*, 125, 87-111.
- CUMINGE (D) et DUBOIS (R), 1969 - Propriétés excrétrices de l'épithélium germinatif de l'embryon de Poulet : étude structurale et autoradiographique au microscope électronique. *C.R. Acad. Sci.*, 269, 74-77.
- DANTCHAKOFF (V), 1929 - Experimentelle Beweise der Keimbahn beim Vogel. *Verh. anat. Ges., Tübingen*, 38, 85-90.

- DANTCHAKOFF (V), 1931 - Keimzelle und Gonade. Die endodermalen Wanderzelle als stammzelle in der Keimbahn. Experimentelle Beweise. *Z. Zellforsch.* 14, 376-384.
- DANTCHAKOFF (V), 1932 - Keimzelle und Gonade. II B. Ganzheit des Gewebekomplexes als faktor in der Entwicklung der Gonade. *Z. Zellforsch.* 15, 581-644.
- DANTCHAKOFF (V), 1933 - Formation d'ébauches gonadiques stériles déterminées par des cellules germinales altérées ou mortes. *C.R. Soc. Biol.*, 113, 874.
- DANTCHAKOFF (V), 1934 - Les bases de la sexualité. Paris, Félix ALCAN, in. 12 127.
- DAVENPORT (C.B), 1911 - The transplantation of Ovaries in Chickens. *J. Morph.* 22, 111-122.
- DEFRETIN (R), 1924 - Origine et migration des gonocytes chez le Poulet. *C.R. Soc. Biol.*, 91, 1082-1084.
- DUBOIS (R), 1962 - Sur la stérilisation de l'embryon de Poulet par irradiation aux rayons X du croissant germinatif extra-embryonnaire. *Arch. Anat. microsc. Morphol. exp.*, 51, 85-94.
- DUBOIS (R), 1964 - Sur l'attraction des éléments germinaux de gonades indifférenciées par le jeune épithélium germinatif chez l'embryon de poulet, en culture in vitro. *C.R. Acad. Sci.*, 258, 5070-5072.
- DUBOIS (R), 1967 - Localisation et migration des cellules germinales de blastoderme non incubé de Poulet d'après les résultats de culture in vitro. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 56, 245-264.
- DUBOIS (R), 1968,a - L'origine et la migration des cellules germinales de l'embryon de Poulet, d'après les résultats d'expériences in vitro. *Thèse Doct. Sc., Paris.*
- DUBOIS (R), 1968,b - Données nouvelles sur l'amaeboïdisme des cellules germinales primordiales de l'embryon de Poulet en culture in vitro. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 2100-2102.
- DUBOIS (R), 1969 - Le mécanisme d'entrée des cellules germinales primordiales dans le réseau vasculaire chez l'embryon de Poulet. *J. Embryol. exper. Morphol.*, 21, 255-270.
- DUBOIS (R) et CUMINGE (D), 1968 - Sur l'aspect ultrastructural et histochemique des cellules germinales de l'embryon de Poulet. *Ann. Histochem.*, 13, 33-50.
- DULBECCO (R), 1946 - Sviluppo di gonadi in assenza di cellule sessuali nell'embrione di pollo. Sterilizzazione completa mediante esposizione a raggi allo stadio di linea primitiva. *Rendic. Acc. Naz. Lincei.*, I, 1211-1213.
- EBERT (J.D), 1950 - An analysis of the effects of anti organ sera on the development, in vitro, of the early chick blastoderm. *J. Exp. Zool.*, 115, 351-377.
- FARGEIX (N), 1966 - Localisation des cellules germinales de l'embryon de Canard au stade des premières paires de somites. *C.R. Acad. Sci.*, 262, 2259-2262.

- FARGEIX (N), 1967 a - Les cellules germinales chez de jeunes embryons de Canard développés à partir de moitiés latérales de blastoderme. *C.R. Acad. Sci.*, 264, 1457-1460.
- FARGEIX (N), 1967 b - Les cellules germinales chez de jeunes embryons de Canard développés à partir de moitiés antérieures et postérieures de blastoderme. *C.R. Acad. Sci.*, 264, 2922-2925.
- FARGEIX (N), 1969 - Les cellules germinales du Canard chez des embryons normaux et des embryons de régulation. Etude des jeunes stades du développement. *J. Embryol. exp. Morph.*, 22, 477-503.
- FIRKET (J), 1914 - Recherches sur l'organogenèse des glandes sexuelles chez les Oiseaux. *Arch. Biol.*, 29, 201.
- FLICKINGER (C) et FAWCETT (D.W), 1967 - The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.*, 158, 207-211.
- GILBERT (G.B) et WOOD-GUSH (D.G.M), 1970 - Observations on ovarian transplants in the domestic fowl and their bearing on normal ovarian function. *Res. Veter. Sci.*, G.B., 11, 156-160.
- GOLDSMITH (J.B), 1928 - The history of the germ cells in the domestic fowl. *J. Morph.*, 46, 275-315.
- GONDOS (B), 1970 - Granulosa cell-germ cell relationship in the developing rabbit ovary. *J. Embryol. exp. Morph.*, 23, 419-426.
- GUTHRIE (C.C), 1908 - Further results of Transplantation of ovaries in chickens. *J. exp. Zool.*, 5, 563-576.
- HAFFEN (K), 1969 - Incompatibilité entre détermination chromosomique et stimulation hormonale dans la différenciation sexuelle. *Ann. Embryol. Morphogen.*, 1969, suppl.1, 223-235.
- HAMBURGER (V), 1960 - A Manual of Experimental Embryology. *The University of Chicago Press.*, 2° Ed., in 8°, 221.
- HAMBURGER (V) et HAMILTON (H.L), 1951 - A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88, 49-92.
- HARA (K), 1961 - Regional neural differentiation induced by prechordal and presumptive chordal mesoderm in the chick embryo. *Thèse Doct. UTRECHT*, 1961.
- HARDISTY (M.W), 1967 - The numbers of Vertebrate primordial germ cells. *Biol. Rev., Cambr.*, 42, 265-287.
- HASEK (M), 1953 - Vegetative hybridization of animals by connection of blood circulation during the embryonal life. *Ceskoslovenska Biol.*, 2, n°5.
- HINRICHS (M.A), 1931 - Ultraviolet Point Radiation in Production of Developmental Abnormalities in the Chick embryo. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 28, 1059-1060.
- HOLLYFIELD (J.C) et ADLER (R), 1970 - Localization of embryonic cells and polystyrene particles within chick embryos after vascular dissemination. *Exper. Cell. Res.*, 59, 76-84.
- HRABA (T), 1956 - Immunologiké chovani embryonalich parabiontu mezi krutou a slepici. *Ceskoslov. Biol.*, 5, 89.

- HUGHES (G.C), 1963 - The population of germ cells in the developing female chick. *J. Embryol. exp. Morph.*, 11, 513-536.
- JORDANOV (J), ANASTASOVA-KRISTEVA (M), HADJIOLOFF (A.I), BOYADJIEVA-MICHAILOVA (A), 1965 - Contribution à l'étude expérimentale de l'histologie des gonades. Culture *in vitro* des ovaires de l'embryon de Poulet. *Balg. Akad. Nauk. Izvest., Inst. Morfol.*, 11, 5-19.
- KEMPENICH-PINTO (O), SCHINDLER (H), BERNSTEIN (S), BAROUTCHEVA (M), 1970 - The fertilization rate of domestic hens after intramaginal or intrauterine insemination with turkey spermatozoa. *J. Reproduct. Fertil.*, 21, 355-357.
- KENT (R), 1961 - The development of the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in the chick. *J. Embryol. exp. Morph.*, 9, 128-137.
- KOMAR (A), 1969 - Primordial germ cells in chick germinal crescent developping as chorio-allantoic or intracoelomic graft. *Zool. Polon.*, 19, 517-533.
- KOSIN (I.L), 1944 - Macro-and microscopic methods of detecting fertility in unincubated hen's eggs. *Poultry Sci.*, 23, 266-269.
- LE DOUARIN (N) et BARQ (G), 1969 - Sur l'utilisation des cellules de la Caille japonaise comme "marqueurs biologiques" en embryologie expérimentale. *C.R. Acad. Sci.*, 269, 1543-1546.
- LEROY (P), 1963 - L'hybridation végétative chez les Oiseaux. *Ann. Biol.*, 2, 337-370.
- LEROY (P), 1969 - Assimilation parentérale d'érythrocytes aviaires par des poulets Rhode Island Red M-44. Résultats et problèmes. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 103, 139-218.
- L'HERITIER (P), 1963 - Sur l'hybridation végétative. *Biol. Med.*, 52, 47 et seq.
- LORENZ (F.W), 1950 - Onset and duration of fertility in turkey. *Poultry Sci.*, 29, 20-26.
- LORENZ (F.W), 1959 - Reproduction in the domestic fowl. *Reproduction in the Domestic Animals. Vol. II - H.H. Cole et P.T. Cupps, éd., Academic Press, New-York.*
- LWOFF (A), 1963 - Sur l'hybridation végétative. *Biol. Med.*, 52, 45-50.
- MAINARDI (D), 1959 - Immunological distances among some gallinaceous birds. *Nature*, 184, 913-914.
- MAINARDI (D), 1963 - Immunological distances and phylogenetic relationships in birds. *Proc. XIII Intern. Ornithol. Congr.*, 103-114.
- MARIN (G), 1959 - Gonadogenesi in assenza di gonociti e azione della radiazioni ionizzante sul differenziamento sessuale dell'embrione di pollo. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 64, 211-235.
- MARTINOVITCH (P.N), KANAZIR (D.T), KNEZEVITCH (Z.A), SIMITCH (M.M), 1961 - Phénomènes téralogiques observés chez les descendants des embryons de poulets traités à la solution de Tyrode et à l'acide désoxyribonucléique dissous dans la solution de Tyrode. *C.R. Acad. Sci.*, 253, 1854-1856.

- MARTINOVITCH (P.N), KANAZIR (D.T), KNEZEVITCH (Z.A), SIMITCH (M.M), 1962 - Teratological changes in the offspring of chicken embryos treated with Tyrode or with Tyrode plus DNA. *J. Embryol. exp. Morph.* 10, 167-177.
- MEYER (D.B), 1960 - Application of the periodic acid-Schiff technique (P.A.S.) to the whole chick embryo. *Stain Technol.*, 35, 83-89.
- MEYER (D.B), 1964 - The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 10, 154-190.
- MIMS (M.F) et McKINNELL (R.G), 1971 - Laser irradiation of the chick embryo germinal crescent. *J. Embryol. exp. Morph.*, 26, 31-36.
- MINTZ (B), 1960 - Formation and early development of germ-cells. *Symp. Germ cells and develop. (Inst. intern. d'Embryol. and Fondazione A. BASELLI).*, 1-24.
- MOSCONA (A), 1952 - Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.*, 3, 535-539.
- NAGANO (T), 1962 - Observations on the fine structure of the developing spermatid in the domestic chicken. *J. Cell Biol.*, 14, 193-205.
- NALBANDOV (A.V) et CARD (L.E), 1943 - Effect of the stale sperm on fertility and hatchability of chicken eggs. *Poultry Sci.*, 22, 218-226.
- NASS (M.M.K) et NASS (S), 1963 - Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell Biol.*, 19, 593-611 et 613-629.
- NICANDER (L), 1967 - An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 83, 375-397.
- NIEUWKOOP (P.D), 1947 - Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells and on the development of the lateral plate and germ ridges in urodeles. *Arch. Neerl. Zool.*, 8, 1-205.
- NOVIKOV (B.G), 1953 - Expériences d'hybridation végétative chez les Oiseaux. *Acad. Sci. Ukr.*, 10, 3-34.
- NOVIKOV (B.G), 1965 - Experimentelle Analyse des somatischen Induktion bei Vögeln. *Wiss. Zeitschr. Karl Marx Univ. Leipzig*, 14, Mathem., 555-567.
- NUSSBAUM (M), 1880 - Zur Differenzierung des Geschlechts im Thierreich. *Arch. Mikr. Anat.*, 18, 1-121.
- OHNO (S), 1969 - The preferential activation of maternally derived alleles in development of interspecific hybrids. *Wistar Inst. Symp. Monogr.*, U.S.A., 9, 137-150.
- OLSEN (M.W), 1960 - Turkey-chicken hybrids. *J. Hered.*, 51, 69-73.
- OLSEN (M.W) et MARSDEN (S.J), 1956 - Parthenogenesis in eggs of Beltsville Small White turkeys. *Poultry Sci.*, 35, 674-682.
- PADOA, 1963 - Le gonadi di girini di Rana esculenta da uova irradiate con ultravioletto. *Monit. Zool.*, 70-71, 238.
- PAVLOV (E.F), 1951 - Hérité de la couleur du plumage chez les poulets après transplantation réciproque des ovaires (en russe). *Izvest. Akad. N. Armianskoï SSR*, 4, n°10.

- PETERSON (R.D), FICHTELIUS (K.E), LIDEN (S), 1967 - An inquiry into the possible reutilization of follicular cell DNA by the mouse oöcyte. *Exp. Cell. Res.*, 48, 118-124.
- PHILIPPS (R.E) et WARREN (D.C), 1937 - Observations concerning the mechanisms of ovulation in the domestic fowl. *J. exp. Zool.*, 76, 117.
- POOLE (H.K) et OLSEN (M.W), 1967 - Effects of prior semen injections and weekly inseminations on hybridization of chickens and turkeys. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 124, 1236.
- PRESS (N), 1959 - An electron microscope study of a mechanism for the delivery of follicular cytoplasm to an avian egg. *Exp. Cell. Res.*, 18, 194-196.
- QUINN (J.P), BURROWS (W.H), BYERLY (T.C), 1937 - Turkey-chicken hybrids. *J. Hered.*, 28, 169-173.
- REAGAN (F), 1916 - Some results and possibilities of early embryonic castration. *Anat. Rec.*, 11, 251-267.
- REYNAUD (G), 1967 - Mise en évidence des cellules germinales primordiales dans les jeunes blastoderms d'Oiseau par la technique de coloration P.A.S. *C.R. Acad. Sci.*, 265, 1636-1639.
- REYNAUD (G), 1969 a - Transfert de cellules germinales primordiales de Dindon à l'embryon de Poulet par injection intravasculaire. *J. Embryol. exp. Morph.*, 21, 485-507.
- REYNAUD (G), 1969 b - Phénomènes de régulation dans les populations de gonocytes primordiaux de Dindon injectés à des embryons de Poulet stérilisés. *C.R. Acad. Sci.*, 268, 2275-2278.
- REYNAUD (G), 1969 c - Application de la réaction de Feulgen à des embryons de Caille entiers et à des feuillets blastodermiques étalés sur lame. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 58, 393-400.
- REYNAUD (G), 1970 a - Transferts interspécifiques de gonocytes primordiaux chez les Oiseaux. *Ann. Biol.*, 9, 495-500.
- REYNAUD (G), 1970 b - Transfert de cellules germinales primordiales chez le Poulet au moyen d'une technique d'injection intravasculaire. *Ann. Fac. Sci. Marseille*, 43, B, 101-105.
- REYNAUD (G), 1971 a - Etude comparée de la multiplication des cellules germinales à la fin de la première semaine de la vie embryonnaire chez trois espèces de Gallinacés (*Gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix japonica*). *Experientia*, 27, 427-428.
- REYNAUD (G), 1971 b - Sur les durées respectives du pouvoir attractif de l'épithélium germinatif et de la réactivité des cellules germinales à ce pouvoir, chez l'embryon de Poulet. *Experientia*, 27, 940-941.
- REYNAUD (G), 1971 c - Etude du croisement, chez *Gallus domesticus*, entre individus normaux et individus porteurs d'un germen de Dindon (*Meleagris gallopavo*) introduit au début de la vie embryonnaire. *C.R. Acad. Sci.*, 273, 1322-1325.

- REYNAUD (G), 1972 - Table et courbe de développement du dindon domestique : *Meleagris gallopavo*. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 97, 95-101.
- RICHARDS (A), HULPIEU (H.R), GOLDSMITH (J.B), 1926 - A restudy of the germ cell history in the fowl. *Anat. Rec.*, 34, 158.
- ROGULSKA (R), 1968 - Primordial germ cells in normal and transected duck blastoderms. *J. Embryol. exp. Morph.*, 20, 247-260.
- ROGULSKA (T), 1969 - Migration of chick primordial germ cells from the intracoelomically transplanted germinal crescent into the genital ridge. *Experientia*, 25, 631-632.
- ROGULSKA (T), OZDZENSKI (W), KOMAR (A), 1971 - Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo. *J. Embryol. exp. Morph.*, 25, 155-164.
- ROMANOFF (A.L), 1960 - The avian embryo. New-York, The MacMillan Company, in 8°, 1305.
- RYCHTER (Z), KOPECKÝ (M), LEMEŽ (L), 1955 - Circulating blood volume in chick embryos (en tchèque). *Ceskoslov. morfol.*, 3, 11-25.
- RYLE (M), 1957 - Studies on possible serological blocks to species hybridization in poultry. *J. Exp. Biol.*, 34, 365-377.
- RYLE (M) et SIMONSEN (M), 1956 - Attempts at hybridization of chickens and turkeys which are tolerant of each others' antigens. *Nature*, 177, 437-438.
- SCHWEIGER-SEIDEL (F), 1866 - Ueber die Samenkörperchen und ihre Entwicklung. *Arch. mikrosk. Anat.*, 1, 309-335.
- SHUMWAY (W) et ADAMSTONE (FB), 1958 - Introduction to Vertebrate Embryology. New-York, John Wiley et Sons.
- SIMON (D), 1960 a - Contribution à l'étude de la circulation et du transport des gonocytes primaires dans les blastoderms d'Oiseau cultivés in vitro. *Arch. Anat. micr. Morph., exp.*, 49, 93-176.
- SIMON (D), 1960 b - Organogenèse et différenciation sexuelle des glandes génitales de l'embryon de Poulet, en l'absence totale des cellules germinales. *C.R., Acad. Sci.*, 251, 449-451.
- SIMONSEN (M), 1955 - Induced tolerance to heterologous cells and induced susceptibility to virus. *Nature*, 175, 763-764.
- SINGH (R.P) et MEYER (D.B), 1967 - Primordial germ cells in blood smears from chick embryos. *Science*, 156, 1503-1504.
- SMITH (L.D), 1964 - A test of the capacity of presumptive somatic cells to transform into primordial germ cells in the mexican axolotl. *J. exp. Zool.*, 156, 229-242.
- SMITH (L.D), 1966 - The role of a germinal plasm in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.*, 14, 330-347.
- SOKOLOVASKAYA (I.I), 1935 - Experiments of distant hybridization of fowls with the use of artificial insemination. *Inst. Hybrid. Acclimat. Domest. Anim. Askania-Nova (LENIN)*, 2, 165-176.

- SWIFT (C), 1914 - Origin and early history of the primordial germ cell in the chick. *Amer. J. Anat.*, 15, 483-516.
- SWIFT (C), 1915 - Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ cells. *Amer. J. Anat.*, 18, 441-470.
- SWIFT (C), 1916 - Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick. *Amer. J. Anat.*, 20, 375-410.
- TABER (E), 1964) - Intersexuality in Birds. In "Intersexuality in Vertebrates including Man" ARMSTRONG et MARSHALL, ed. ACADEMIC PRESS, London, 1964, 8, 285-310.
- TANG YUAN LEE, 1965 - Turkey-chicken hybrid. *Mem. Coll. nation. Taiwan Univ.*, 8, 141-145.
- VAN LIMBORGH (J), 1961 - La répartition numérique des cellules germinales sur les ébauches gonadiques. Un critérium précoce du sexe génétique chez l'embryon de Canard. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 50, 469-485.
- VAN LIMBORGH (J), 1968 - Le premier indice de la différenciation des gonades chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 57, 79-90.
- VANNINI (E), 1945 - Ripartizione dei gonociti primari e origini dell' *asimmetria* delle gonadi nell'embrione di pollo. *Atti Inst. ven. Sc. Let. Art.*, 104, 1-20.
- VENZKE (W.G), 1954 - The morphogenesis of the indifferent gonad of chicken embryos. *Amer. J. Veter. Res.*, 15, 300-308.
- WARREN (D.C) et SCOTT (H.M), 1935 - An attempt to produce turkey-chicken hybrids. *J. Hered.*, 26, 105-107.
- WEISMANN (A), 1885 - Die continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. *Jena, G. FISCHER*, 8, 122.
- WEISS (P) et ANDRES (G), 1952 - Experiments on the fate of embryonic cells (chick) disseminated by the vascular route. *J. exp. Zool.*, 121, 449-488.
- WIESNER (B.P), 1923 - Die Funktionsfähigkeit autophor transplantierter Ovarien bei Ratten. *Arch. mikr. Anat.*, 99, 140-149.
- WOLFF (Et), Dir., 1964 - L'origine de la lignée germinale chez les Vertébrés et chez quelques Invertébrés. *Paris, Hermann*.
- WOODGER (J.H), 1925 - Observations on the origin of the germ cells of the fowl (*Gallus domesticus*). *Quart. J. microsc. Sci.*, 69, 445-462.
- WYBURN (G.M), JOHNSTON (H.S), AITKEN (R.N.C), 1966 - Fate of the granulosa cells in the hen follicle. *Z. Zellforsch.*, 72, 53-65.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Abréviations utilisées dans les légendes

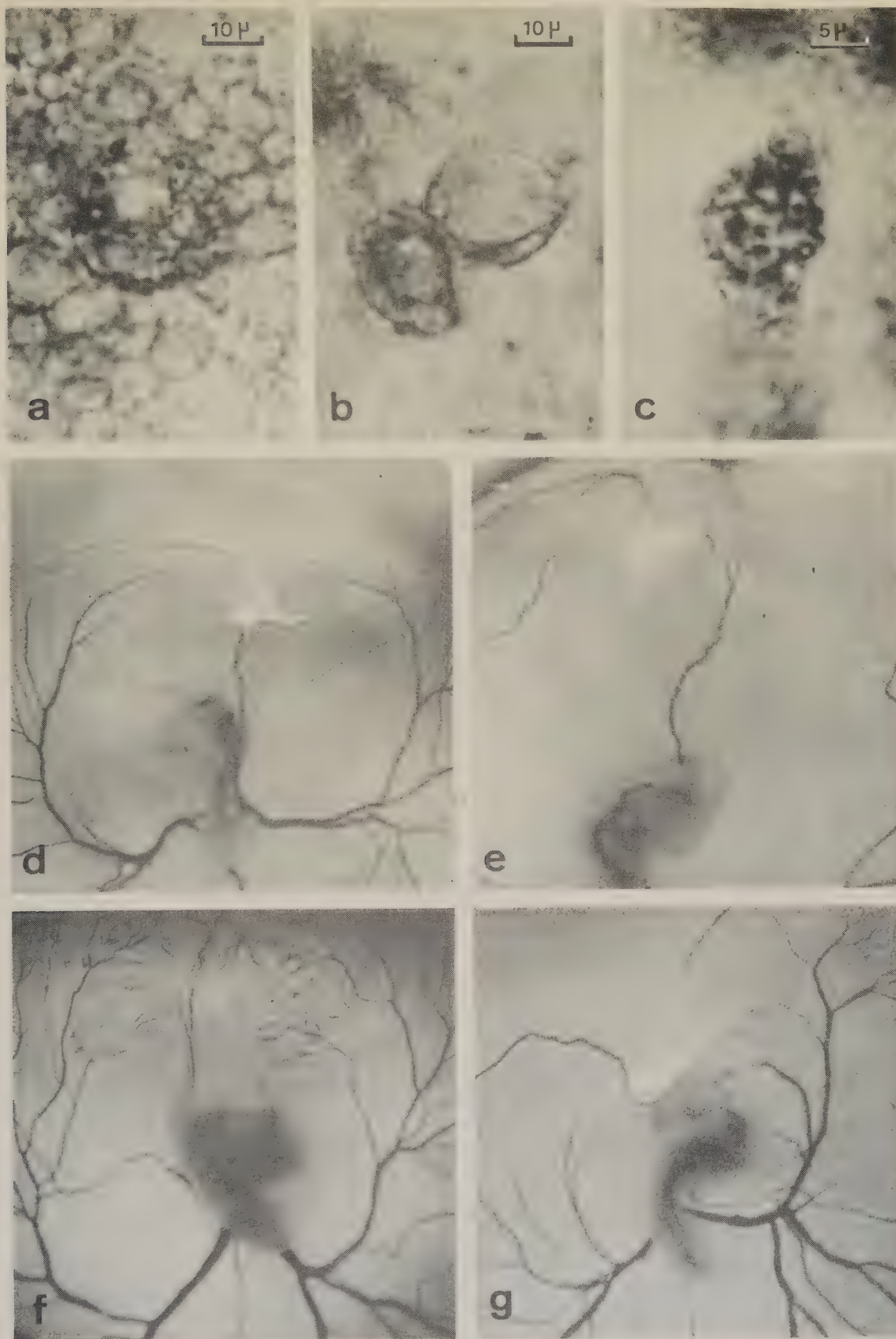
CGP : cellule germinale primordiale

U.V. : rayons ultraviolets

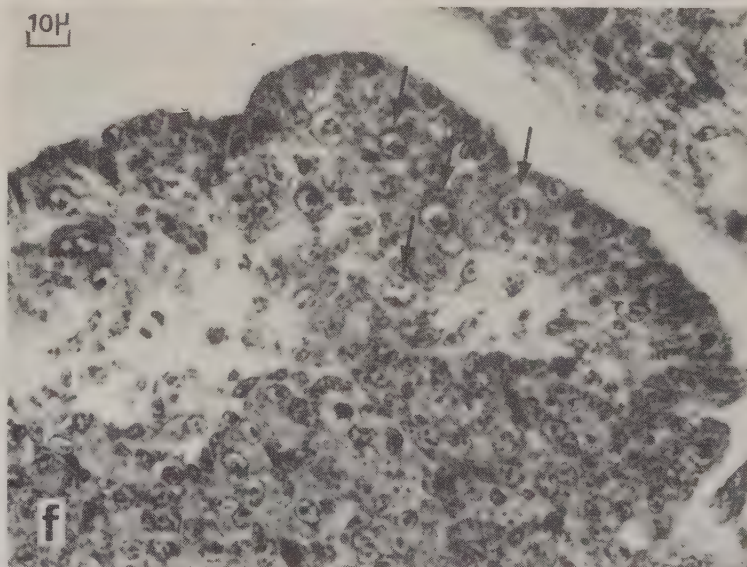
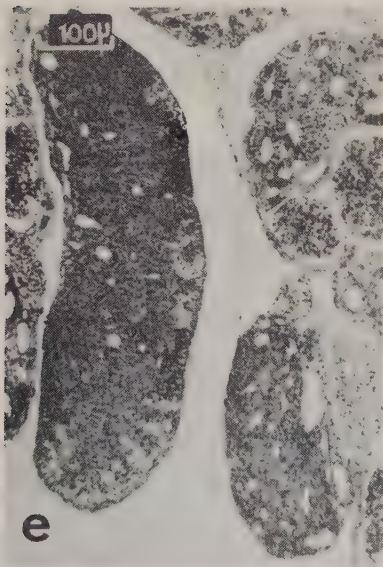
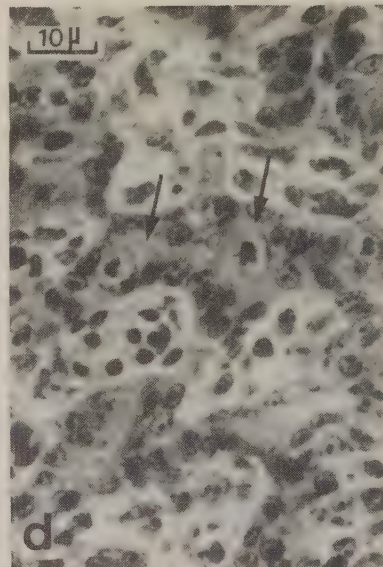
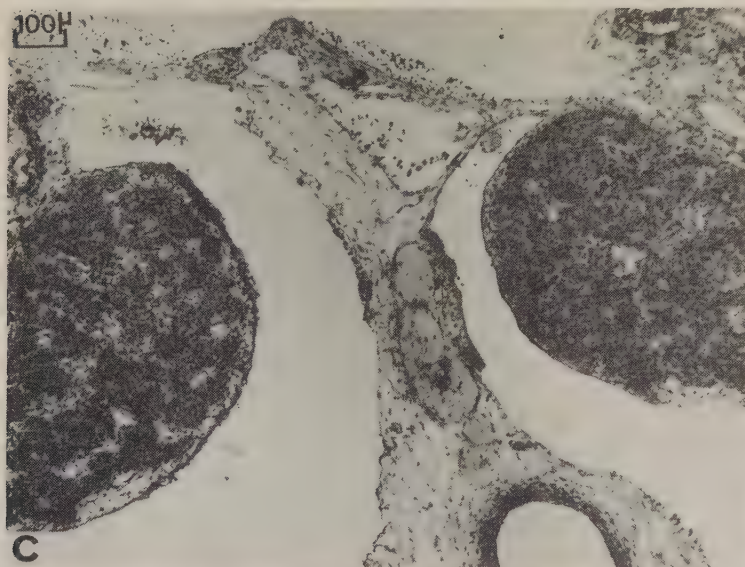
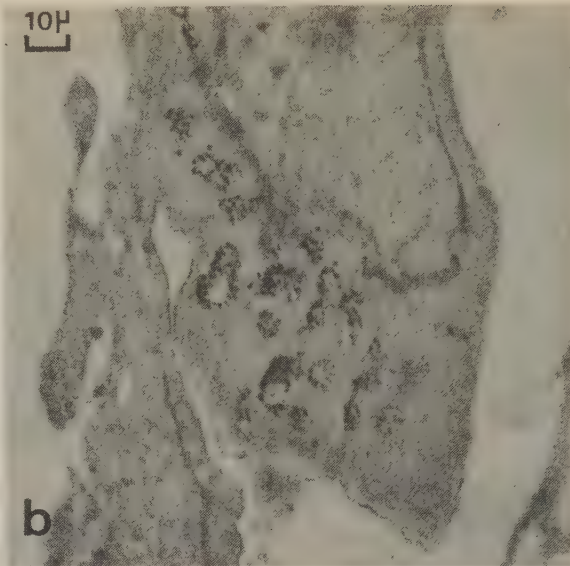
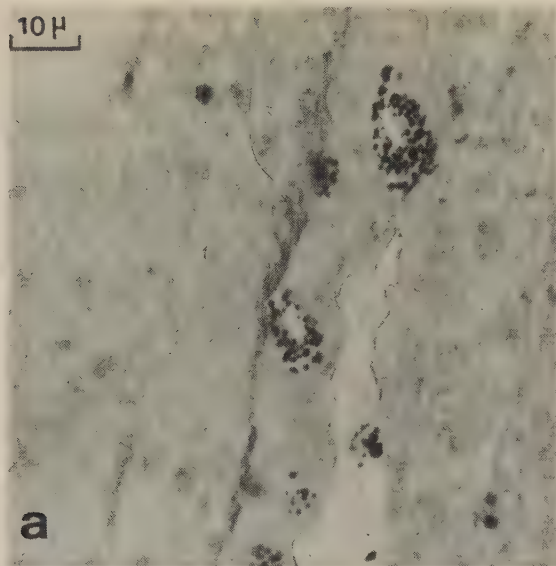
G, M, M(g), R(w), W(r) } cf. sigles et nomenclature, p.28
R, RW, W, WR

hématox. : hématoxyline

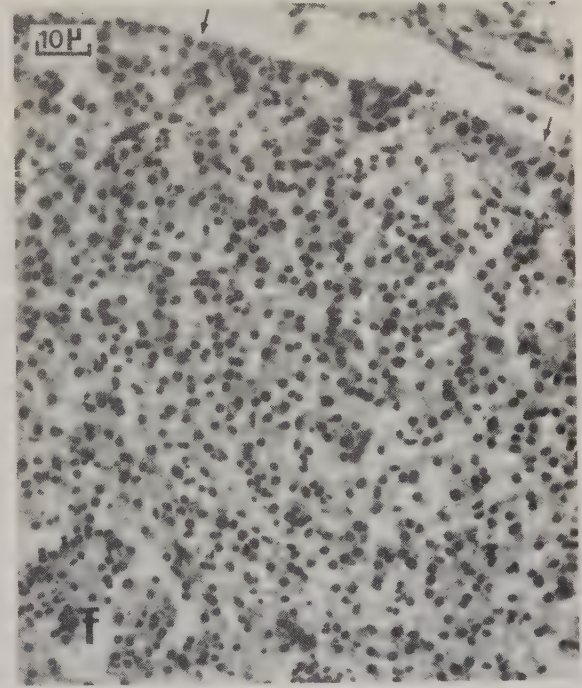
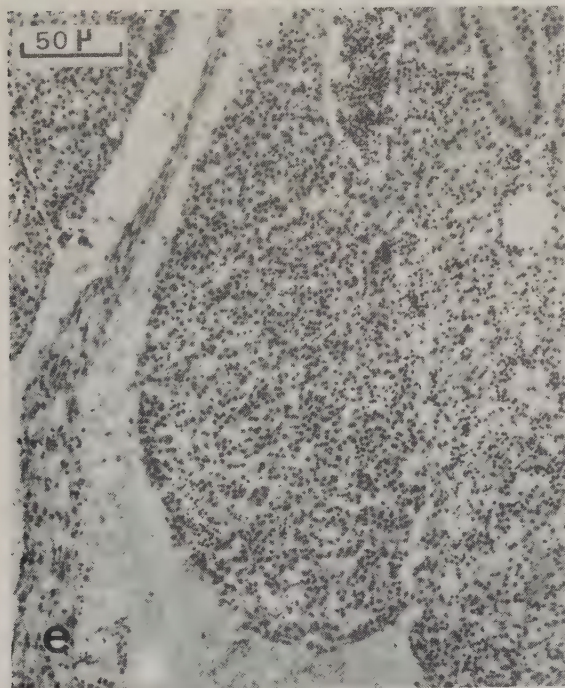
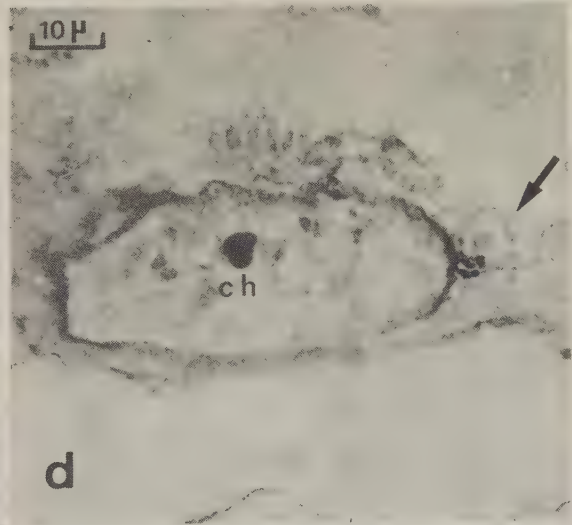
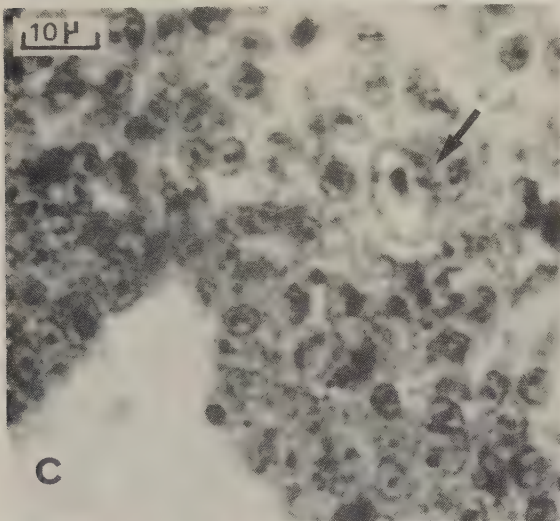
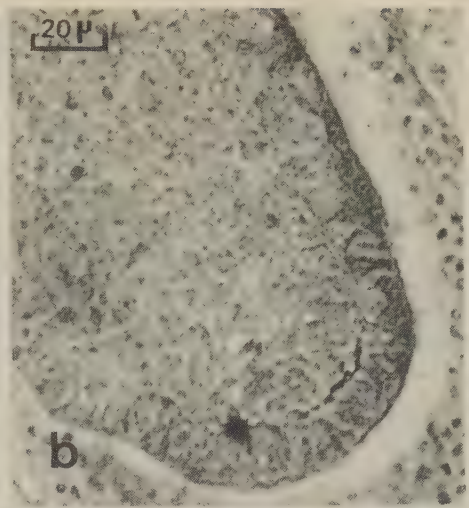
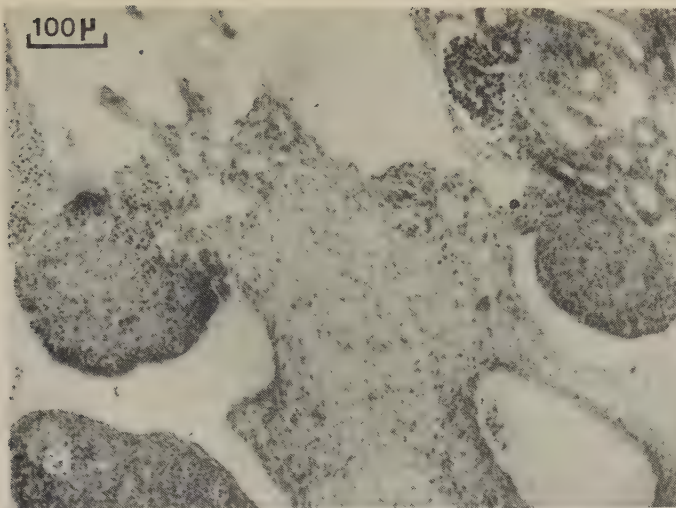
Trichrom. : technique trichromique de P. MASSON.



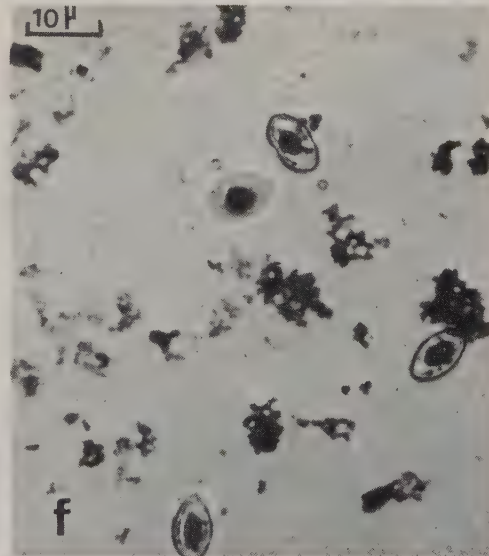
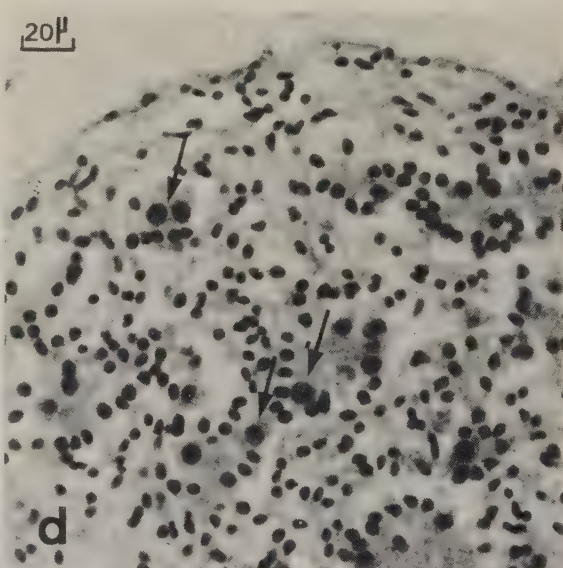
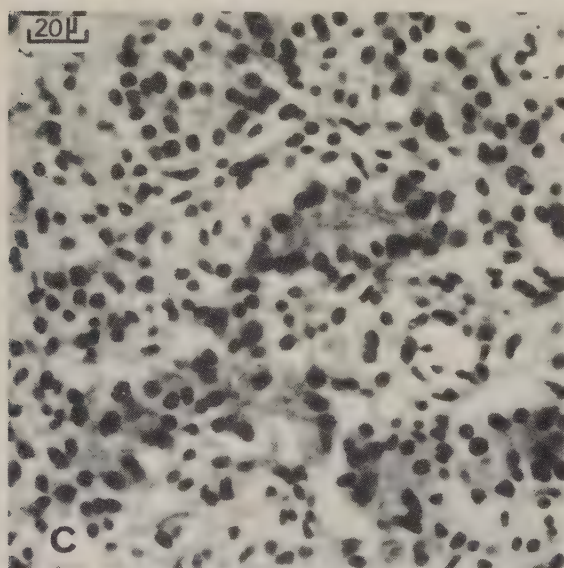
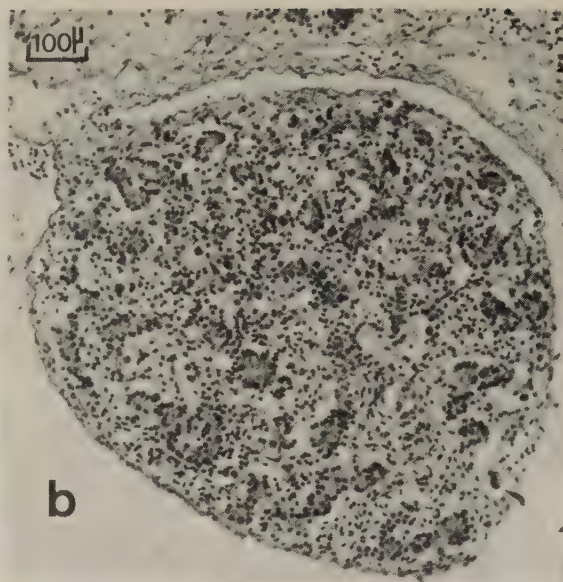
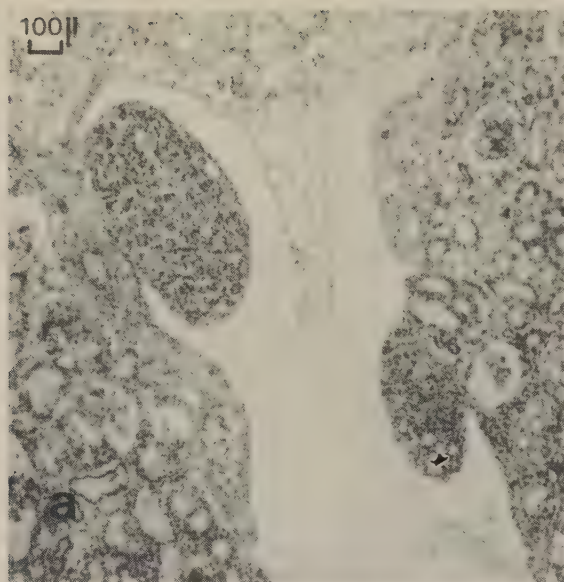
a) CGP hypertrophiée dans le croissant germinal, 3h après son irradiation. *PAS*.
 b) 2 CGP à l'aspect « vide », 6 h après l'irradiation. *PAS*.
 c) CGP normale dans un croissant germinal non irradié, au stade 6 HH. *PAS, hématox.*
 d, e, f, g) Altération des vaisseaux vitellins dans le territoire irradié. L'embryon g est microcéphale.



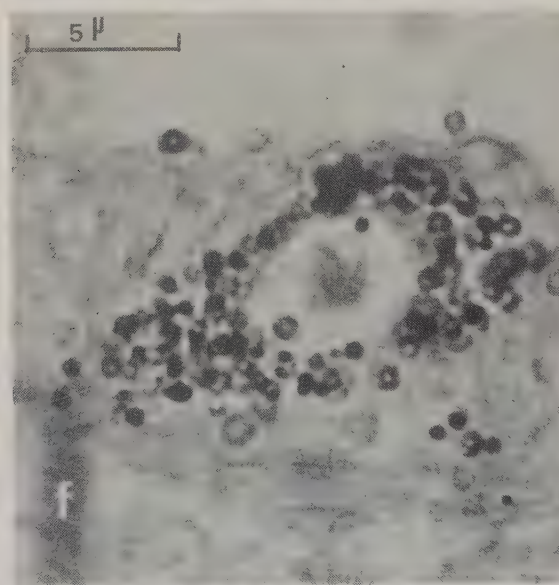
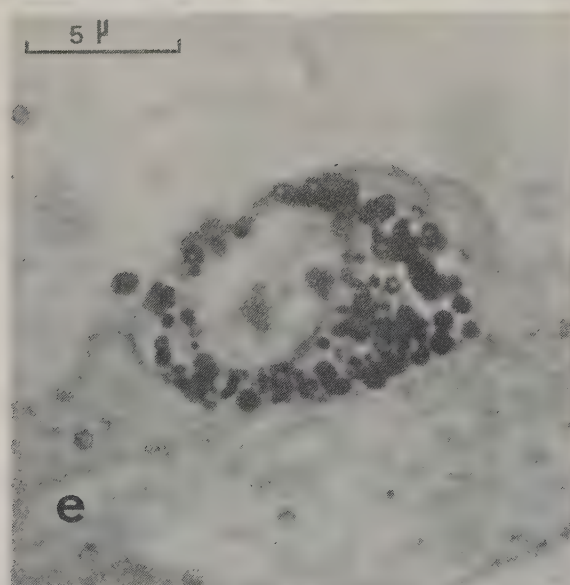
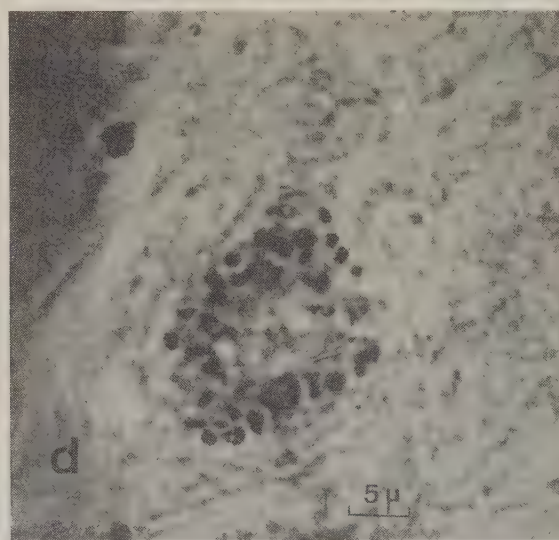
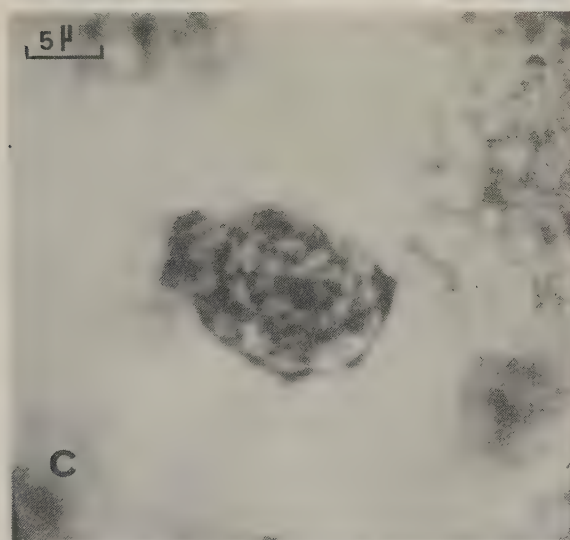
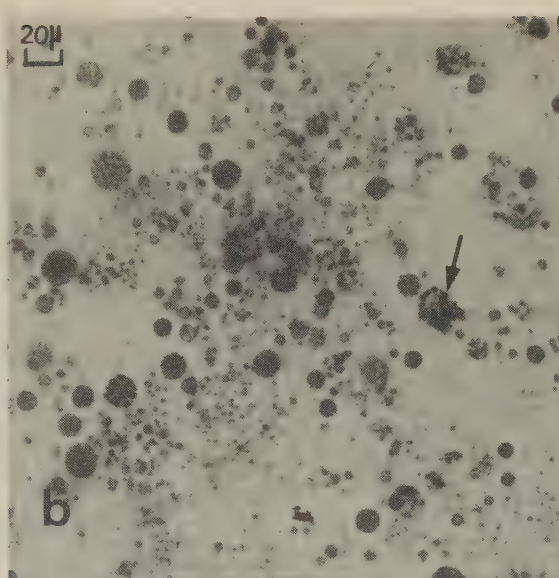
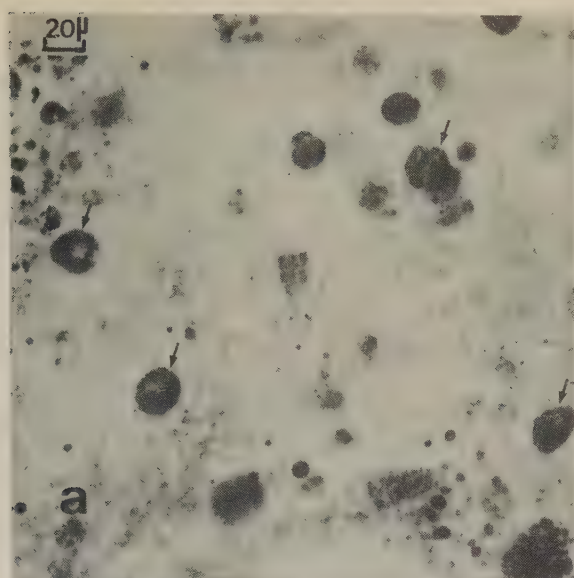
- a) Gonocytes primaires dans l'épithélium germinatif à 5 j.
 b) Ebauche gonadique d'un embryon de 6 j montrant la 1ère poussée de cordons sexuels. PAS (a, b).
 c, d) Ebauches testiculaires à 8 j. A fort grossissement (d), les cordons sexuels montrent des gonocytes primaires (↙).
 e, f) Ebauches ovariennes à 8 j. L'épithélium germinatif de l'ovaire gauche (f) a amorcé sa 2e poussée de cordons sexuels (↙ : gonocytes primaires). Trichrom. (c, d, e, f).



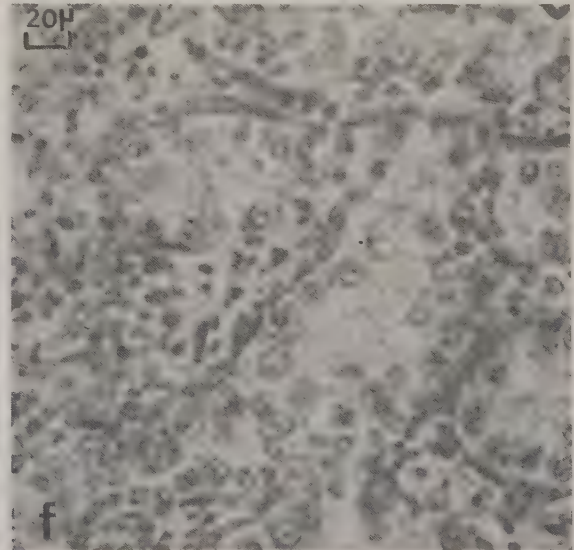
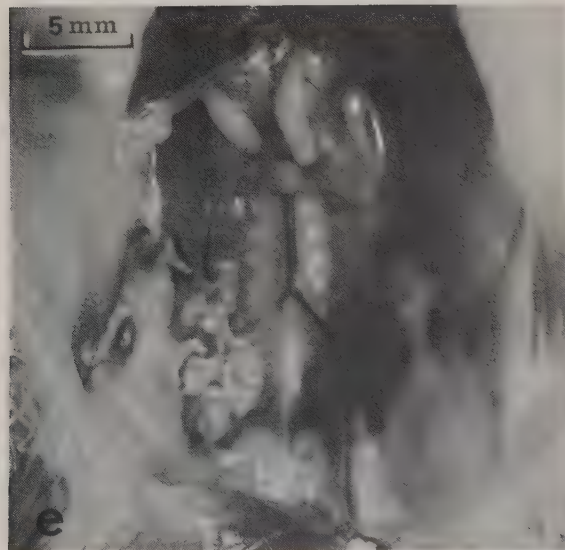
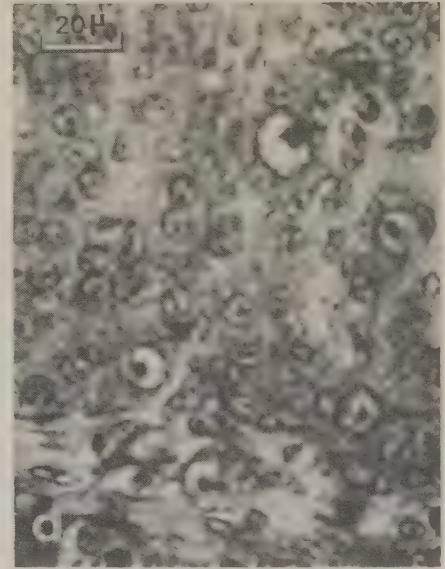
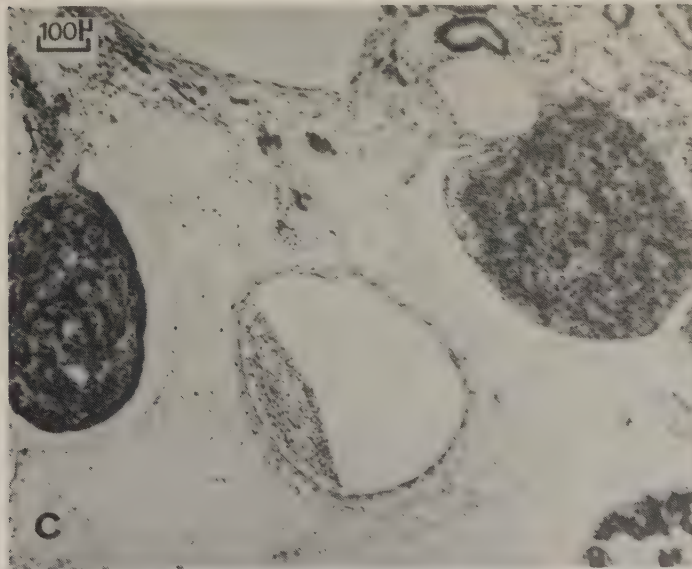
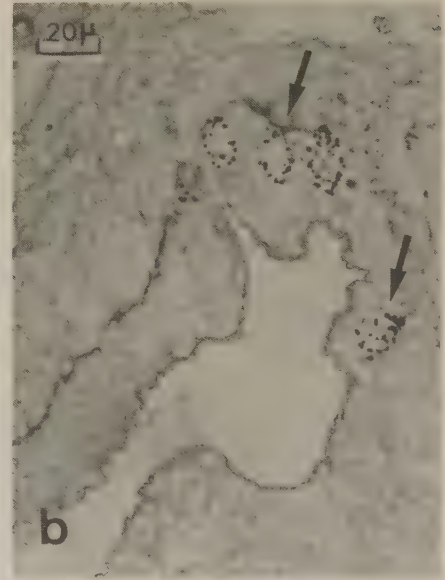
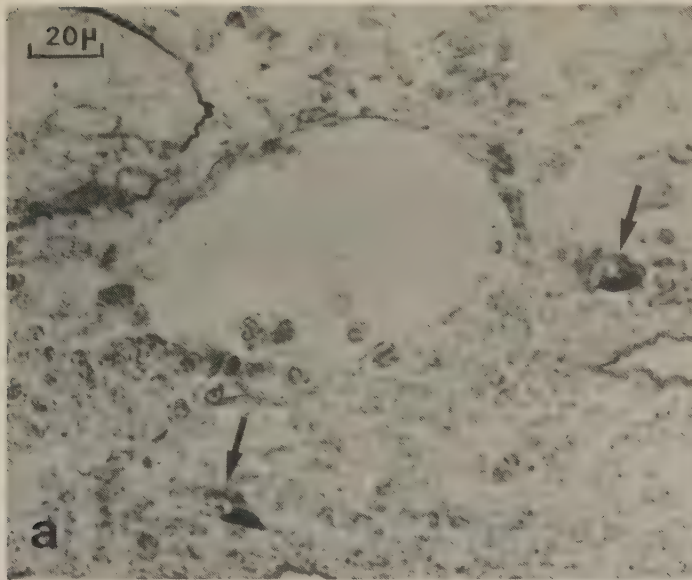
a, b) Crêtes génitales stériles d'embryons de 5 j. *PAS*.
 c) CGP hypertrophiée (↙) chez un embryon de 4 j. *Hémalun*.
 d) CGP « égarée » (↙) près de la corde dorsale (ch) chez un embryon de 4 j. *PAS*.
 e, f) Ebauche ovarienne stérile d'un embryon de 9 j. A fort grossissement (f), l'épithélium germinatif (↙) ne montre aucun gonocyte. *Hémalun*.



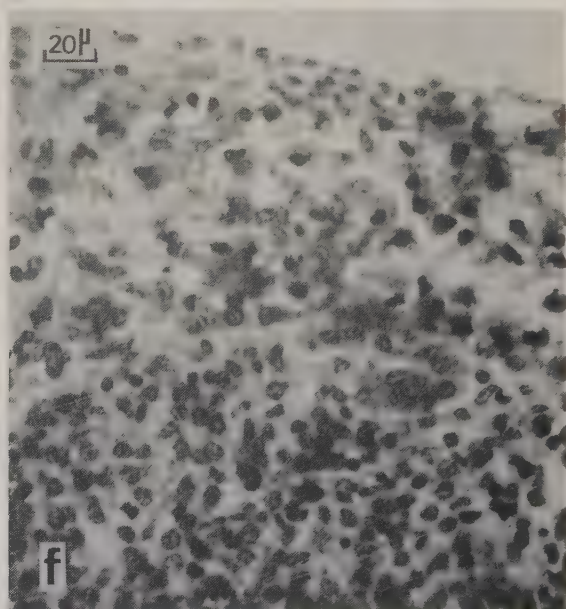
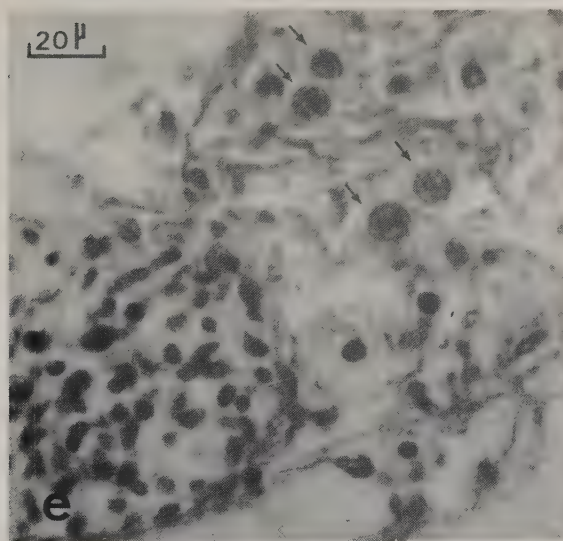
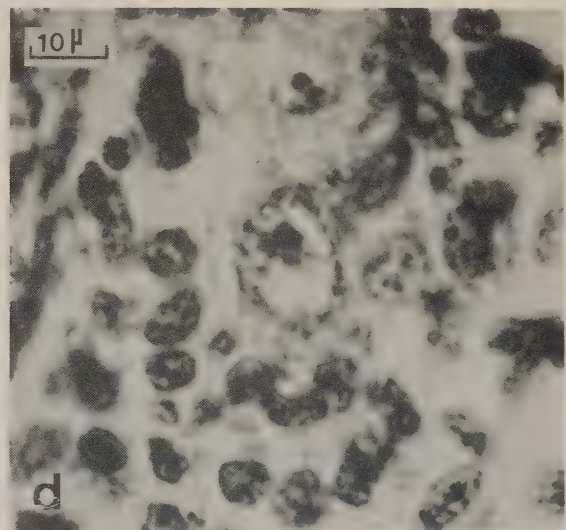
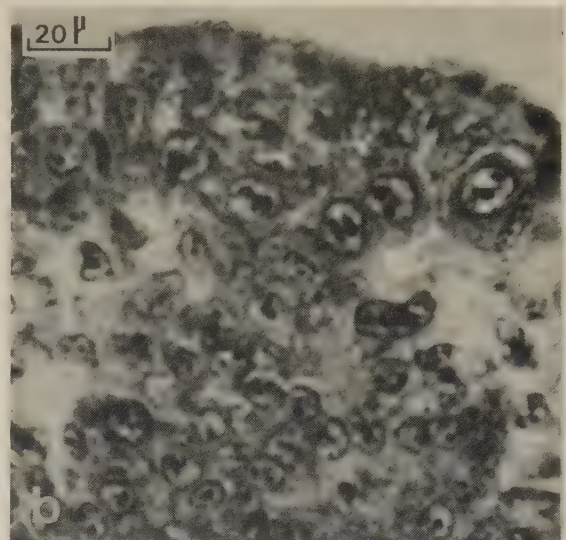
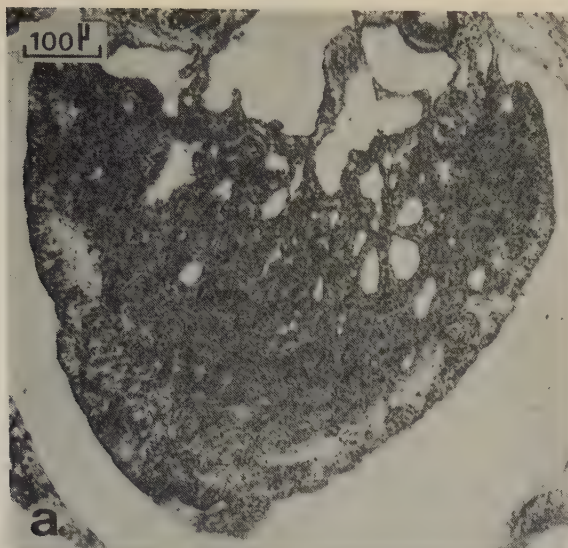
- a, c) Ebauches testiculaires stériles à 12 j. A fort grossissement (c), on ne décèle aucune spermatogonie dans les cordons séminifères. *Trichrom.*
 b, d) Ebauche testiculaire normale à 15 j. A fort grossissement (d), on voit plusieurs spermatogonies (↙). *Trichrom.*
 e) Coq Rhode Island Red stérile, à l'âge de 8 mois.
 f) Liquide séminal du coq stérile. On n'observe que des débris cellulaires et quelques érythrocytes.



- a) Endoblaste du croissant germinal de Dindon montrant plusieurs CGP (↙). PAS.
 b) Suspension cellulaire obtenue par dissociation du croissant germinal. Une CGP (↙) est visible. PAS.
 c) CGP de Poulet dans le croissant germinal. PAS, hématox.
 d) CGP de Dindon dans le croissant germinal.
 e) Gonocyte primaire de Poulet dans l'épithélium germinatif.
 f) Gonocyte primaire de Dindon dans l'épithélium germinatif. PAS (d, e, f).



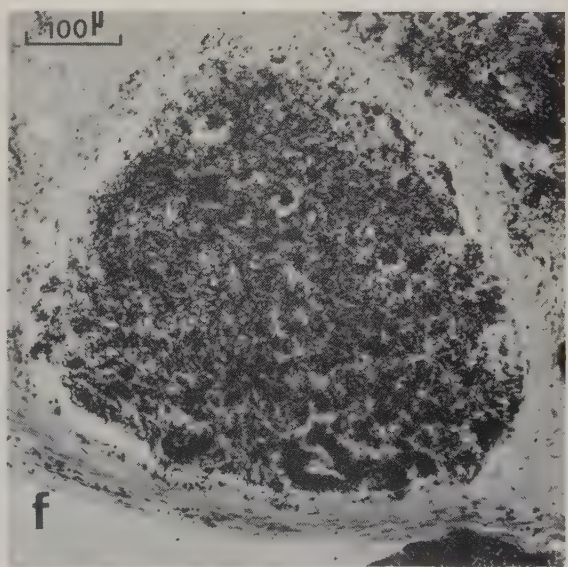
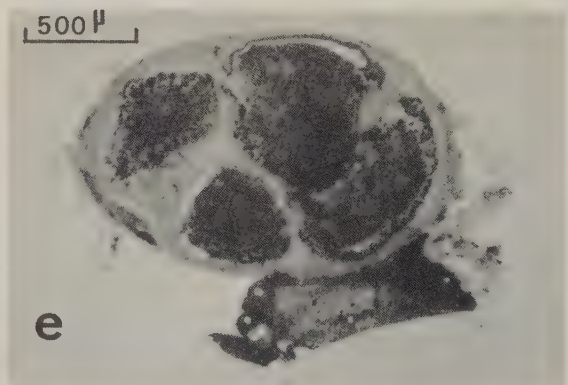
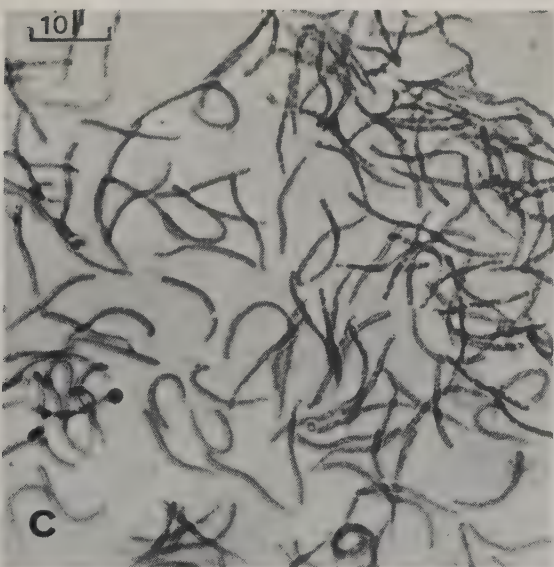
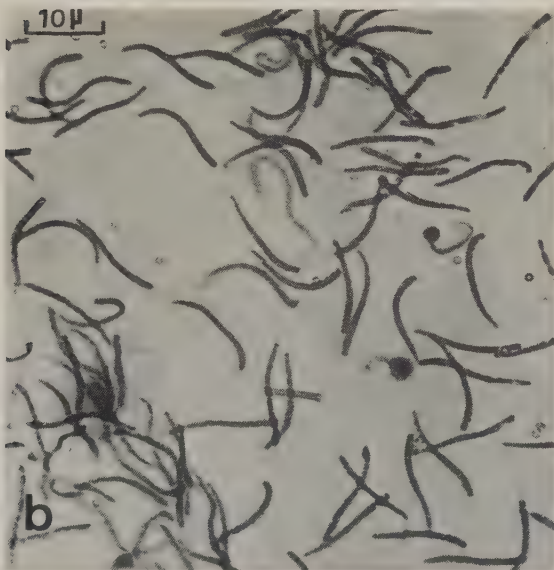
- a, b) Gonocytes de Dindon (✓) dans les crêtes génitales d'embryons de Poulet de 4 j (a) et 5 j (b) injectés à 3 j. PAS.
 c, d) Ebauches testiculaires d'un embryon de 7 j, injecté à 3 j. A fort grossissement (d), les cordons médullaires montrent de gros gonocytes de Dindon. *Trichrom*.
 e) Cavité abdominale d'un embryon de 21 j, injecté à 3 j, montrant des testicules normalement développés.
 f) Coupe d'un testicule de 21 j montrant de nombreuses spermatogonies à l'intérieur des tubes séminifères. *Hémalun*.



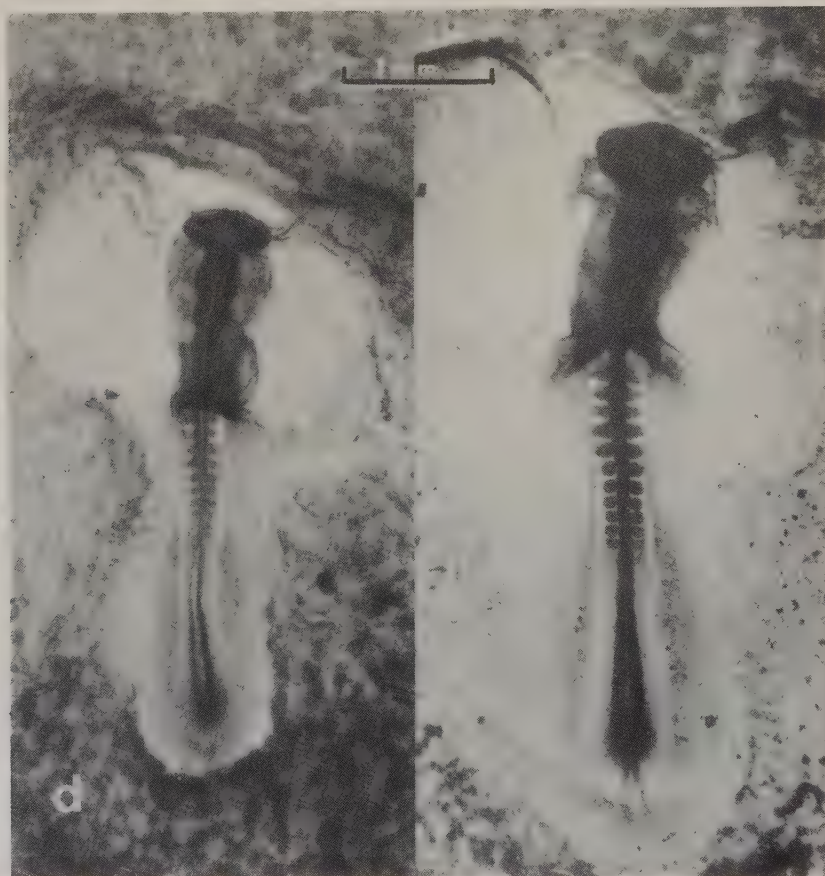
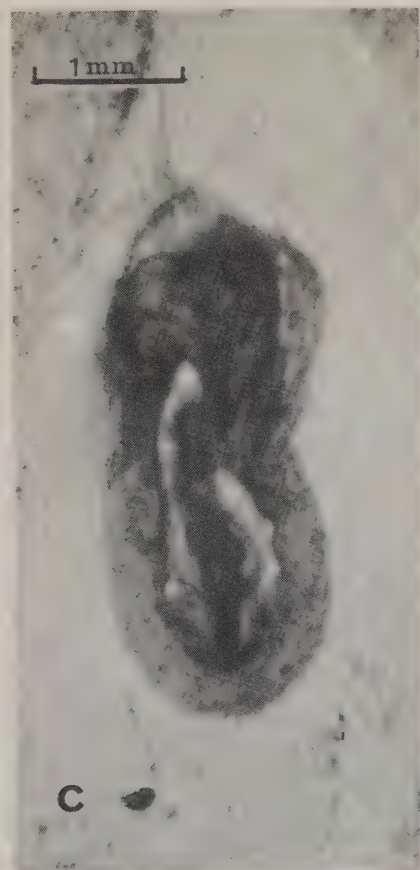
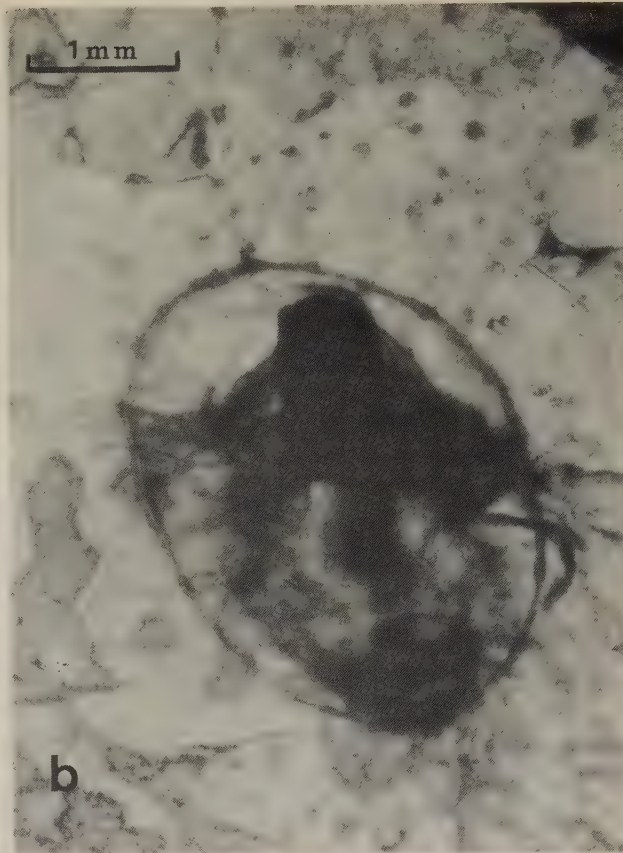
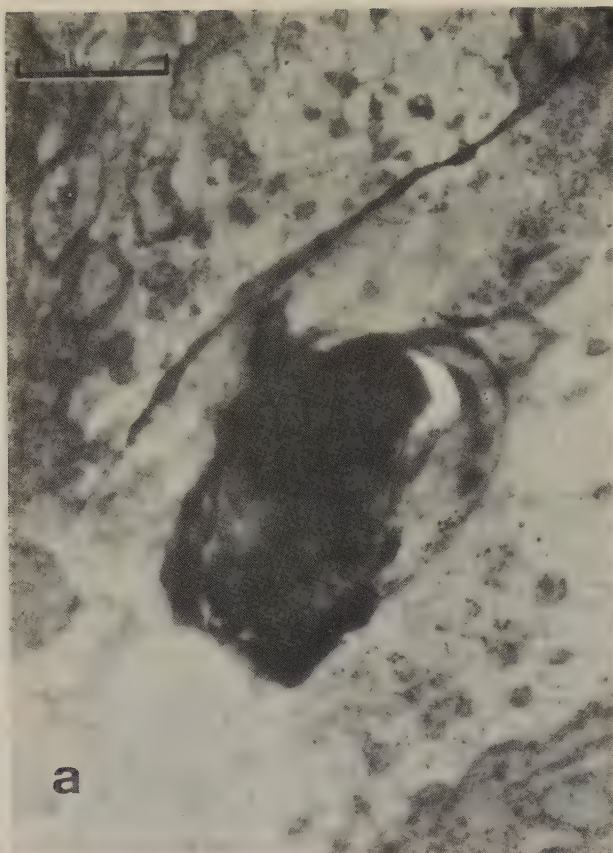
- a, b) Ebauche ovarienne d'un embryon de 8 j injecté à 3 j. A fort grossissement (b), l'épithélium germinatif montre de gros gonocytes de Dindon. *Trichrom*.
 c) Cavité abdominale d'un embryon de 20 j, injecté à 3 j, montrant un ovaire normalement développé.
 d) Ovocyte laire de dinde ayant commencé sa phase d'accroissement dans un ovaire de poule de 20 j. *Trichrom*.
 e) Medulla d'une gonade femelle droite à 19 j montrant 4 gonocytes (↙) introduits à 4 j par injection. *Hémalun*.
 f) Ovaire stérile d'un embryon de 19 j injecté à 5 j. *Hémalun*.



- a) Coq M(g) n° 1, à 7 j.
b) Coq M(g) n° 1, à 14 mois.
c) Coq M(g) n° 2, à 7 j.
d) Coq M(g) n° 2, à 12 mois. Noter l'anomalie de la patte gauche visible sur les 2 clichés (c et d).



- a) Spermatozoïdes de dindon normal
 b) Spermatozoïdes du coq M(g) n° 1
 c) Spermatozoïdes de coq normal
 d) Appareil génital du coq M(g) n° 2. Les testicules et le tractus sont normalement développés.
 e, f) Canal déférent du coq M(g) n° 2. A fort grossissement (f), on observe de très nombreux spermatozoïdes. *Hématox.-éosine.*
- } *Erythrosine,*
Bleu de méthylène.

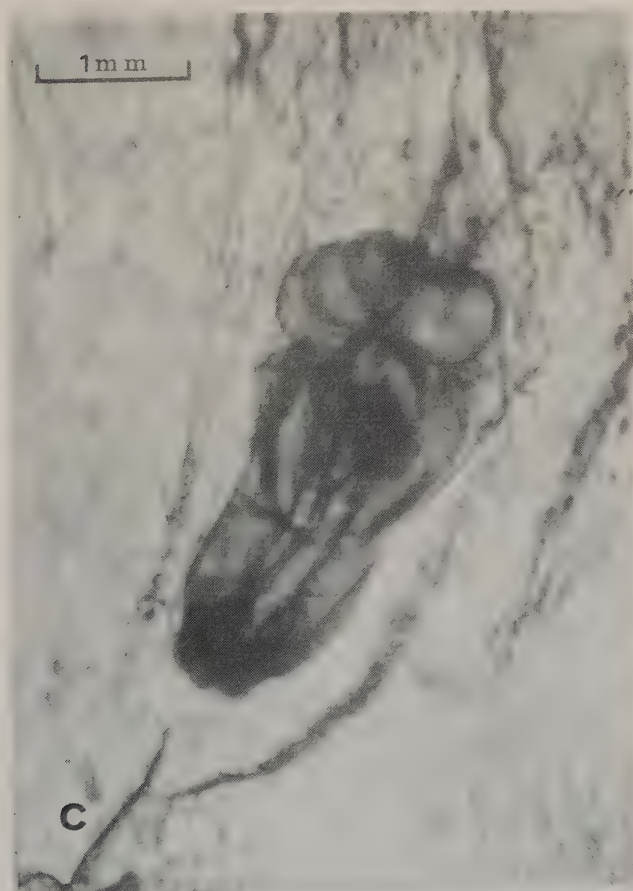


a, b) Embryons anormaux, de stade indéterminable, situés au sein d'une aire vasculaire bien développée. *Picro-indigo-carmin*.

c) Embryon montrant une torsion du tube neural, une multiplication anarchique des somites et un coeur hypertrophié, en position anormale. *Hémalun*.

d) A gauche : microembryon bloqué au stade 10+HH.

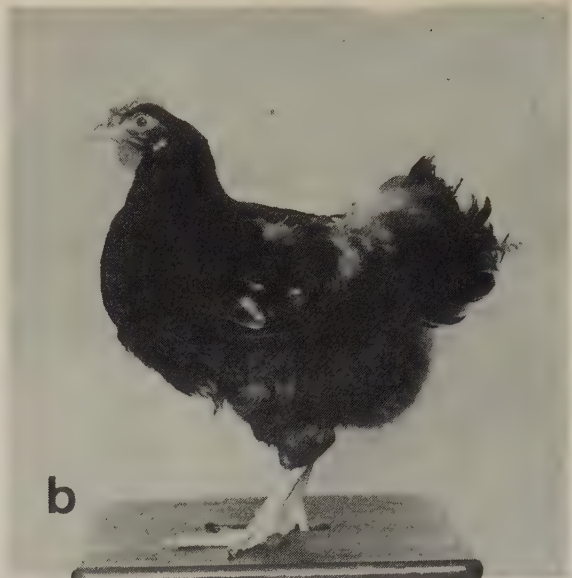
A droite : embryon de Poulet témoin. *Picro-indigo-carmin*.



- a, b) Embryons anormaux, situés au centre d'une aire vasculaire bien développée. *Hémalun*.
 c) Microembryon montrant un encéphale hypertrophié et très anormal. *Hémalun*.
 d) Embryon présentant une malformation des vésicules céphaliques antérieures (pro- et mésencéphale). *Hémalun*.



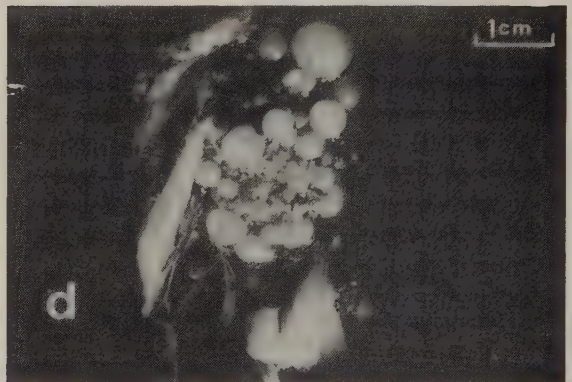
a



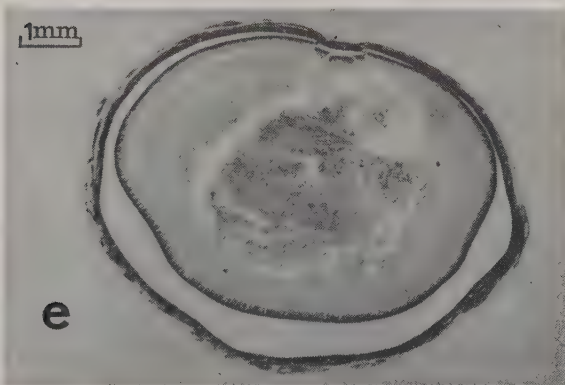
b



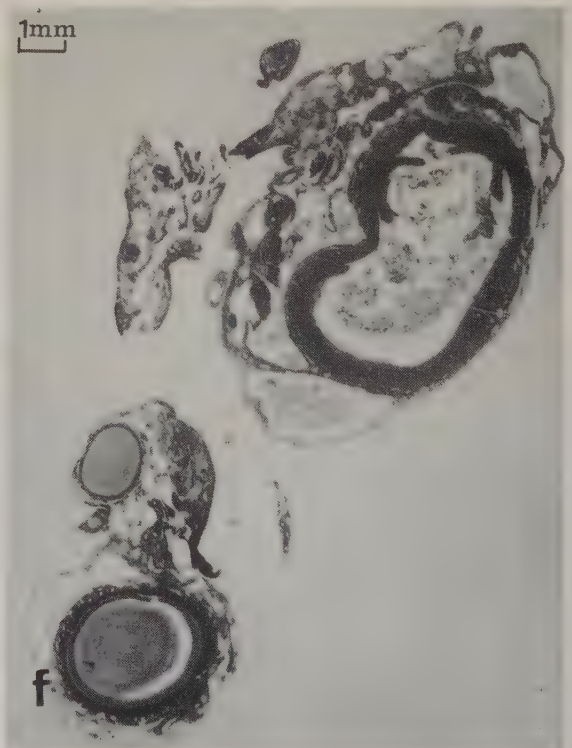
c



d



e



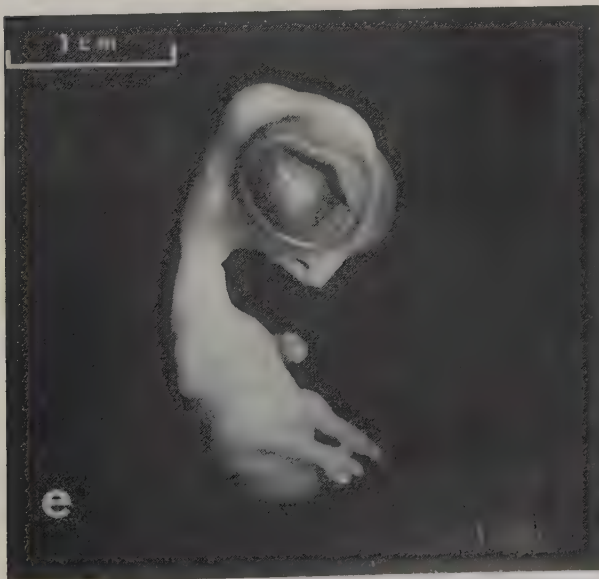
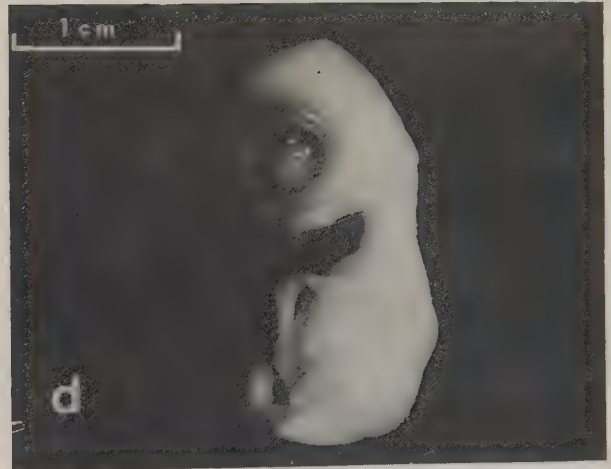
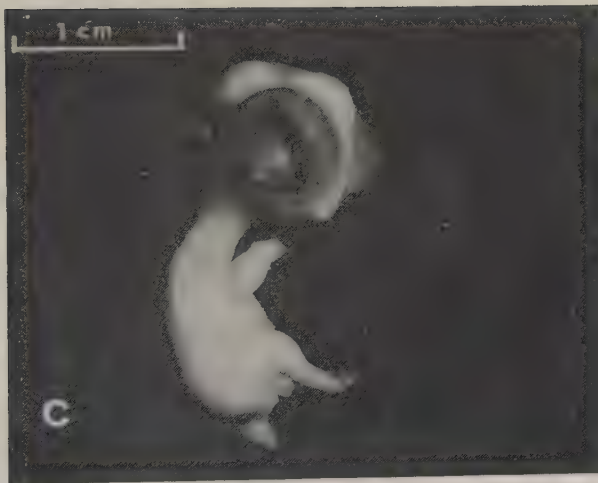
f

a, b) Poule M(g) à 7 jours (a) et à 12 mois (b).

c, d) Appareil génital normalement constitué (c) et ovaire (d) de la poule M(g).

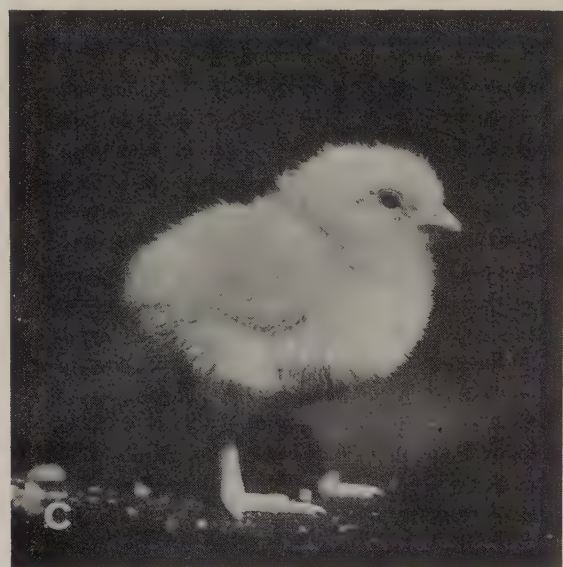
e) Follicule ovarien contenant l'un des plus gros ovocytes (8 mm) observés dans l'ovaire de M(g). *Hématox.-éosine*.

f) Portion de l'ovaire montrant des ovocytes de différentes tailles. *Hématox.-éosine*.

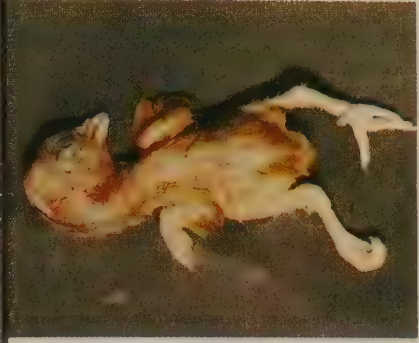


a) Microembryon monstrueux dans un sac amniotique hypertrophié
 b) Embryon de stade 17 HH montrant une *spina bifida* (↙). Carmin.
 c, e) Embryons de 9 j (32 HH) et 10 j (34 HH) d'aspect normal

d) Embryon anormal de 10 j (34 HH)
 f) Embryon de 15 j (38 HH). Noter la présence de *praepennae* sombres sur la cuisse (↙).



a, b) Poule R(w) n° 1, à 2 jours (a) et à 9 mois (b).
c, d) Poule R(w) n° 2, à 2 jours (c) et à 8 mois (d).
e, f) Poule W(r) à 2 jours (e) et à 8 mois (f).



$WW(r)$ 14



$WR \sigma$



$WR \sigma$



$WW(r)$ 19



$WR \text{♀}$



$WR \text{♀}$



$WW(r)$ 12 - 16



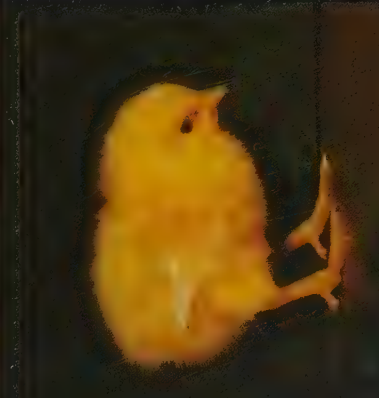
$WW(r)$ 18



$WW(r)$ 18



$WW(r)$ 10



W



W





"Vu et permis d'imprimer

Marseille, le 14 JUIN 1973

Le Président :

F. BOREL"

CENTRE REGIONAL DE RECHERCHE ET DE DOCUMENTATION PEDAGOGIQUES
SERVICE D'IMPRESSION - 55, RUE SYLVABELLE - 13006 MARSEILLE

Dépôt légal : 2e Trim. 1973